

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika



Jiří Zahradník

Bakteriální metabolismus morfinových alkaloidů

Morphine alkaloid metabolism in bacteria

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Pavel Kyslík, CSc.

Praha, 2016

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 5. srpna 2016

.....
Jiří Zahradník

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Pavla Kyslíkovi, CSc. za jeho vedení mé práce.

Za cenné rady a nápady děkuji členům Laboratoře enzymových technologií RNDr. Andree Palyzové, PhD., RNDr. Evě Kyslíkové, RNDr. Heleně Marešové, RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. a také člence Laboratoře biomolekulárního rozpoznávání Ing. Lucii Kolářové.

Za umožnění vykonávat tuto diplomovou práci v Laboratoři enzymových technologií a Laboratoři biomolekulárního rozpoznávání děkuji vedoucím laboratoří - RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc. a Ing. Bohdanu Schneiderovi, CSc., DSc.

Za stylovou a jazykovou korekturu děkuji PhDr. Jaromíru Nigrinovi, CSc.

Za pomoc a ochotu při konfokální mikroskopii děkuji RNDr. Zoře Novákové, Ph.D. a za pomoc se stanovením produkce peroxidu vodíku děkuji RNDr. Marku Vrbackému, Ph.D.

Tato práce byla vypracována v letech 2014-2016 za přispění Grantové Agentury Univerzity Karlovy, projekt Bakteriální metabolismus morfinových alkaloidů (č. 720414). Práce byla vypracovávána v Laboratoři enzymových technologií Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. a v Laboratoři Biomolekulárního rozpoznávání Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i.

Abstrakt

Alkaloidy morfinové řady a jejich deriváty jsou nenahraditelné farmaceuticky významné látky. Díky jejich obrovské produkci a spotřebě se z nich stávají významné polutanty, které jsou detekovány v povrchových vodách.

Cílem této práce bylo charakterizovat vliv alkaloidů morfinové řady na fyziologii tří modelových organismů: *Agrobacterium* sp. R89-1, *Escherichia coli* XL-1 (Blue), a *Raoultella* sp. KDF8, a objasnění mechanismů vedoucích k toxicitě meziproduktů jejich metabolismu.

Nejprve byl charakterizován biotransformační potenciál a utilizační schopnosti studovaných mikroorganismů. Bylo prokázáno, že mikroorganismus *Agrobacterium* sp. R89-1 je schopný rychlé biotransformace kodeinu na jeho 14-OH deriváty, ale zároveň jsou u něj projevy toxických účinků nejvyšší. Mikroorganismus *Raoultella* sp. KDF8 je oproti tomu charakteristický kompletní utilizací kodeinu jako zdroje uhlíku a energie a k akumulaci 14-OH derivátů u něj nedochází. *Escherichia coli* XL-1 (Blue) kodein netransformuje ani neutilizuje. Jako nejtoxičtější meziprodukty metabolismu kodeinu byly nalezeny α,β -nenasycené ketony (morfinon, kodeinon, 14-OH-morfinon a 14-OH-kodeinon).

Růst bakteriálních buněk kmenů R89-1 a KDF8 v přítomnosti kodeinu je provázen vyvoláním buněčné odpovědi na oxidační stres. Jak bylo zjištěno, tento stres je vyvolán Michaelovou adicí kodeinonu na volné thiolové skupiny v buňce (glutathion, cystein) a je prohlouben kovy katalyzovanou autooxidační reakcí kodeinonu, při které vzniká 14-OH-kodeinon. Pro průběh autooxidační reakce je rozhodující vnitrobuněčná dostupnost Mg^{2+} a Mn^{2+} iontů, které reakci katalyzují.

O přežití buněk v prostředí s kodeinem rozhoduje akumulace toxických α,β -nenasycených ketonů. Buňky, u kterých k biotransformaci kodeinu na tyto látky nedochází, jsou vůči toxickým účinkům rezistentní (*E. coli* XL-1). V opačném případě je zásadní přítomnost dalších enzymů schopných biotransformovat α,β -nenasycené morfinanové ketony na jejich netoxické deriváty.

Klíčová slova:

Reaktivní formy kyslíku (ROS), biotransformace, biodegradace, kodein, Michaelova adice

Abstract

Morphine alkaloids and their derivatives are pharmaceutically important substances. Huge production and consumption of these compounds predetermines them to be significant pollutants in the environment. Some of them have been detected in surface waters.

The aim of this study was to characterize effects of morphine alkaloids on the physiology of three model organisms: *Agrobacterium* sp. R89-1, *Escherichia coli* XL-1 (Blue), and *Raoultella* sp. KDF8, and elucidation of the mechanisms leading to toxicity.

The biotransformation potential and utilization ability were characterized for model organisms. It was demonstrated that the microorganism *Agrobacterium* sp. R89-1 is capable of rapid biotransformation of codeine to its 14-OH derivatives. The manifestation of morphine compounds toxic effects for the strain R89-1 is the highest. In contrast, microorganism *Raoultella* sp. KDF8 is able to utilize codeine as a carbon and energy source. The accumulation of 14-OH-derivatives was not observed. *Escherichia coli* XL-1 (Blue) is not able to biotransform or utilize codeine. α , β -unsaturated ketones (morphinone, codeinone, 14-OH-morphinone and 14-OH-codeinone) were found as a most toxic intermediates of codeine metabolism.

Bacterial cell growth (strains R89-1 and KDF8) in the presence of codeine is characteristic with the presence of cellular response to oxidative stress. The principle of this phenomenon was found. Codeinone-induced stress is mediated by Michael addition on free thiol groups (glutathione, cysteine) and accelerated by incidental metal ion-catalyzed autooxidation of codeinone to 14-OH-codeinone. The critical requirement for autooxidation is the intracellular availability Mg^{2+} and Mn^{2+} ions.

Cell survival in a codeine environment is highly dependent on the accumulation of toxic α , β -unsaturated ketones. Cell without capability to metabolize the codeine are not influenced by the toxic effects (*Escherichia coli* XL-1). Otherwise, the presence of morphinone reductase is essential.

Keywords:

Reactive oxygen species (ROS), biotransformation, biodegradation, codeine, Michael addition

Seznam použitých zkratk

SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
CV	Objem kolony, z angl. "Column volume"
OYE	Proteinová rodina – tzv. starého žlutého enzymu, z angl. "Old yellow enzyme"
PDB	Server poskytující strukturní data o proteinech, z angl. "Protein data bank"
ROS	Reaktivní formy kyslíku, z angl. "Reactive oxygen species".
CCM	Česká sbírka mikroorganismů, z angl. "Czech collection of microorganism"
GFP	Zelený fluorescenční protein, z angl. "Green fluorescent protein"
LB	Luria-Bertani živný bujón
LBTE	Luria-Bertani medium doplněné o stopové prvky
BSBTE	Minerální medium doplněné o stopové prvky
PBS	Fosfátový pufr se solemi, z angl. "Phosphate buffer saline"
CFU	Počet životaschopných buněk, z angl. "Colony forming unit"

Zkratky použitých chemikálií jsou uvedeny v kapitole 4.1.2.

Obsah

1 Úvod	10
2 Cíl práce	11
3 Přehled literatury	12
3.1 Antropogenní polutanty	12
3.1.1 Analgetika jako farmaceutické mikropolutanty	12
3.1.2 Látky morfinové řady	15
3.2 Biotransformace a biotechnologické aplikace	16
3.2.1 Známé biotransformační reakce látek morfinové řady	16
3.2.2 Enzym morfin-6-dehydrogenáza	18
3.2.3 Morfinon reduktáza	18
3.2.4 Heroin esteráza	19
3.1.5 Cytochromy P450	19
3.2.6 Katabolismus kodeinu	20
3.3 Oxidační stres v bakteriích	21
3.3.1 Obranné mechanismy buňky proti oxidačnímu stresu	21
3.3.2 Fentonovy reakce	22
3.3.3 Peroxidace lipidů	23
4 Experimentální část	25
4.1 Materiál	25
4.1.1 Biologický materiál	25
4.1.2 Chemický materiál	27
4.1.3 Ostatní materiál	28
4.1.4 Přístrojové vybavení	29
4.2 Metody	30
4.2.1 Media a kultivace mikroorganismů	30
4.2.1 Příprava kompetentních buněk a transformace	31
4.2.2 Heterologní exprese proteinu XdpB	32
4.2.3 Chromatografické metody	33
4.2.4 Elektroforetické metody	34
4.2.5 Spektrofotometrické metody	35
4.2.6 Metody studia oxidačního stresu	36
4.2.7 Konfokální mikroskopie	39
4.2.8 Metody hmotnostní spektrometrie	40
4.2.9 Stanovení toxicity	41
5 Výsledky	43
5.1 Biotransformační schopnost vybraných mikroorganismů	43

5.2 Toxicita morfinových látek vůči kmeni R89-1.....	44
5.3 Proteomická studie rostoucí kultury <i>Raoultella</i> sp. KDF8	46
5.4 Michaelova adice.....	49
5.5 Studium oxidačního stresu	51
5.6 Studium exprese OYE	55
6 Diskuse.....	58
7 Souhrn	66
8 Seznam literatury	67

1 Úvod

Kodein, morfin a thebain jsou izochinolinové alkaloidy vyskytující se v rostlinách máku setého (*Papaver somniferum* L.) a máku listenatého (*Papaver bracteatum* L.). Jejich použití ve farmaceutickém průmyslu je nenahraditelné. Bohužel tento fakt sebou nese i svá negativa. Roční globální produkce látek morfinové řady je v desítkách tun a o jejich osudu v životním prostředí máme jen pramálo informací. Cílem mé diplomové práce nesoucí název: „Bakteriální metabolismus morfinových alkaloidů“ je přispět k současným poznatkům na poli degradace morfinových látek a jejich vlivu na prokaryotní organismy v prostředí.

Diplomová práce byla vypracována v letech 2014-2016 za přispění Grantové Agentury Univerzity Karlovy jako projekt Bakteriální metabolismus morfinových alkaloidů (č. 720414). Záběr zkoumané problematiky byl natolik široký, že jsem se rozhodl pro sepsání práce pouze z části získaných výsledků tak, aby vznikl ucelený a konzistentní celek odpovídající svým rozsahem Diplomové práci. Moje diplomová práce se zabývá především vlivem morfinových alkaloidů na fyziologii mikrobiální buňky, která je spjata s navozením oxidačního stresu. V závěrečné kapitole – Přílohy – si dovoluji čtenáře seznámit, pro rozšíření, i se zbývající studovanou problematikou.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je studium dopadu alkaloidů morfinové řady na fyziologii tří modelových prokaryotních organismů a snaha o odhalení možných mechanismů vedoucích k toxicitě některých reakčních meziproduktů. Modelové organismy pro tuto studii byly zvoleny tak, aby pokrývaly spektrum biotransformačních schopností od úplné absence metabolismu alkaloidů morfinové řady u *Escherichia coli* XL-1 (Blue), přes aktivní činnost morfin-6-dehydrogenázy (první enzym degradační dráhy) u *Agrobacterium* sp. R89-1 až po schopnost kompletně využít kodein jako zdroj uhlíku a energie u mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8.

Smyslem této práce je získat nové poznatky, které by mohly vést k pochopení mikrobiální degradace morfinových alkaloidů a odhalení možných rizik, které z ní pro buňky a prostředí vyplývají. Ze studované problematiky lze vymezit tři dílčí cíle práce:

- Nalezení a charakterizace toxických morfinanů. Objasnění jejich role v metabolismu.
- Charakterizace stresové odpovědi u bakterií *Agrobacterium* sp. R89-1 a *Raoultella* sp. KDF8 pomocí diferenční analýzy proteomu.
- Navržení mechanismů toxických účinků vybraných substrátů a jejich experimentální ověření.

3 Přehled literatury

3.1 Antropogenní polutanty

Antropogenní polutanty, tedy odpadní látky spjaté s lidskou činností, jsou dnes běžnou součástí životního prostředí. Každý den jsou lidstvem introdukovány do ovzduší, půdy i vodního prostředí tisíce chemikálií v rozdílných množstvích (Caliman a kol. 2009). Průmyslové polutanty jsou nejčastěji detekovanými látkami. Zvláště pak v povrchových vodách (Deblonde a kol. 2011). Tento fakt již vedl k legislativním změnám, k intenzivnímu monitoringu a zavedení opatření do běžné praxe. Farmaceutické mikropolutanty tvoří druhou nejčastější skupinu látek detekovaných v povrchových vodách (Tijani a kol. 2016). Na rozdíl od průmyslových polutantů jim dlouhou dobu nebyla věnována taková pozornost a tak jsou naše informace o osudu těchto látek v životním prostředí dosud omezené. Chemicky se jedná o velmi odlišné skupiny organických látek, které nepojí žádné společné vlastnosti. Každá z těchto látek je tedy unikátní a podléhá specifickým chemickým a biologickým pochodům. Čistírny odpadních vod nejsou konstruované na odstraňování nízkých koncentrací těchto látek (Caliman a Gavrilesu 2009) a to zvláště kvůli limitaci sekundárních částí odbourávacího procesu (biologické filtry a fáze aktivovaného kalu) (Gavrilesu a kol. 2015, Rodríguez-Delgado a kol. 2016). Výsledkem nedostatečného odstranění nežádoucích farmaceutických mikropolutantů je jejich uvolnění do povrchových vod, kde mohou škodlivě působit. Situace je v takovém případě kritická u látek s omezenou biologickou odbouratelností nebo s omezenou biologickou dostupností, protože dochází k postupnému narůstání jejich koncentrací.

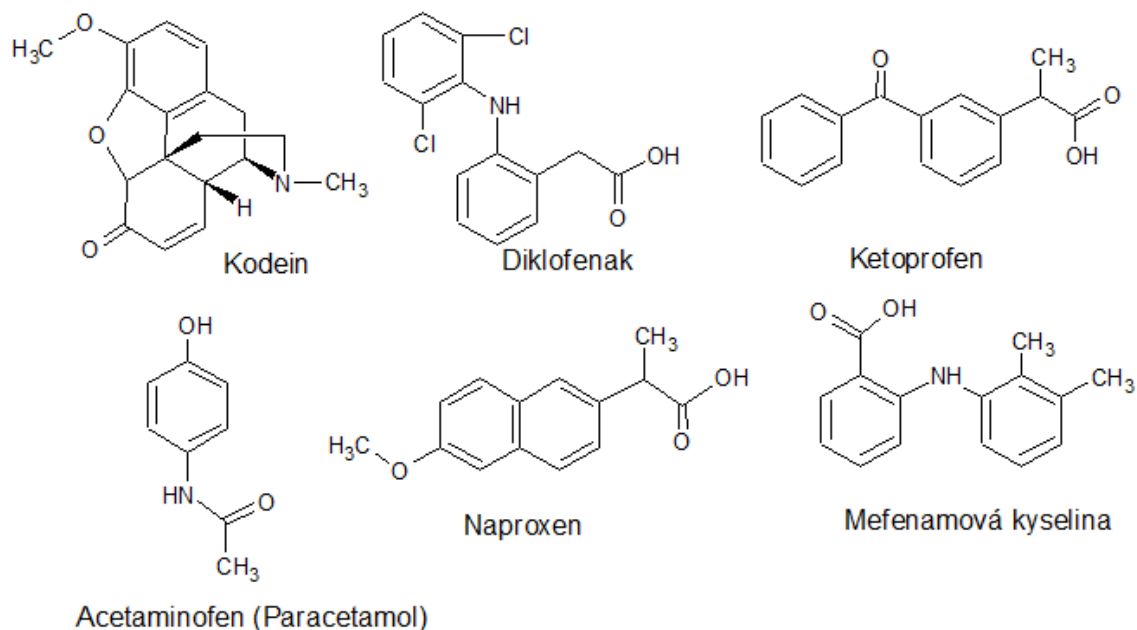
Výzkumný panel při Evropské komisi vydává každý rok tzv. Watch list ('dohledový list', http://ec.europa.eu/index_en.htm), ve kterém jsou zařazeny všechny látky, u kterých je vyžadován dohled a je podezření z jejich negativního působení na životní prostředí. U látek, u kterých je potvrzeno negativní působení, jsou učiněny legislativní kroky k omezení možných rizik.

3.1.1 Analgetika jako farmaceutické mikropolutanty

Analgetika jsou farmaceutické látky, které se používají k dosažení analgesie, tedy stavu bez bolesti. Jsou velmi významnou skupinou a to jak z pohledu diverzity účinných látek,

tak i z pohledu jejich celkové spotřeby. Ta je řadí mezi nejvíce konzumované látky vůbec. Nejčastěji prodávané léky v ČR, které v celkovém množství významně převyšují všechny ostatní, jsou léky na pharyngitidální onemocnění (jednoduchá respirační onemocnění). Zvláště pak přípravky určené k symptomatické léčbě – analgetika, antipyretika, antitusika a další. Z pohledu aktivních látek se pak jedná v první řadě o ibuprofen a paracetamol. V ČR se prodá téměř 1,8 mil balení (rok 2009) léčiv z ATC skupiny N02BE01 (paracetamol) – tedy nejméně přes 20 tun aktivní látky paracetamolu. Spotřeba ostatních analgetik se pohybuje stále v hodnotách tun aktivních látek za rok. Zhruba 50 – 80 % všech aktivních farmaceutických látek požitých člověkem je z těla vyloučeno v nezměněné nebo biologicky dostupné formě (Verlicchi a kol. 2010). Monitoring distribuce, prodeje a spotřeby farmak vykonává v ČR Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL).

Není proto překvapením, že analgetika tvoří více než 25 % farmaceutických mikropolutantů vůbec (Escher a kol. 2011). Rozsáhlá studie popisující degradaci farmaceutických mikropolutantů ve Španělsku rozdělila farmaceutické polutanty podle biologické odbouratelnosti v čistírnách odpadních vod. Analgetika spadají do všech kategorií – dobře odbouratelná, středně odbouratelná a neodbouratelná. Téměř úplně je odbourán acetaminofen, kyselina salicylová, naproxen a ibuprofen. Do střední třídy 50 – 65 % spadají analgetika kodein a diklofenak a do kategorie látek s nízkým odbouráním se zařadil ketoprofen a mefenamová kyselina (Bueno a kol. 2012). Chemická struktura těchto látek je ukázána na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1 – Chemické vzorce běžných analgetik. Struktury byly vytvořeny za pomoci programu ACD/ChemSketch Free 12.0 (<http://www.acdlabs.com/>).

Acetaminofen neboli **Paracetamol** je vůbec nejvíce užívaným ne-opioidním analgetikem běžně dostupným v ČR. Některé studie uvádějí koncentrace v odpadních vodách téměř $180 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Bueno a kol. 2012). Paracetamol se dostává do povrchových vod i přesto, že čistírny odpadních vod odbourají většinu z přítokového množství (až 99 %).

Ibuprofen, druhé nejužívanější analgetikum je i přes o něco nižší biologickou odbouratelnost srovnatelný s paracetamolem. Byl detekován ve vodách odcházejících z čistírny odpadních vod v nižších koncentracích než paracetamol – $3 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Buser a kol. 1999). Vzhledem k tomu, že se jedná o racemickou látku s enantiomery, je pod dohledem výzkumných týmů i tento faktor, který může mít významný dopad na biologickou funkci (Matamoros a kol. 2009).

Diklofenak je nesteroidní protizánětlivé analgetikum a již byl klasifikován jako škodlivý environmentální polutant s toxickými účinky v potravních řetězcích (Naidoo a kol. 2009). Jeho toxický účinek na Supa indického (*Gyps indicus*, S.) je již mediálně známou událostí. Byla zjištěna také toxicita pro některé mořské ryby (Lolić a kol. 2015). Diklofenak byl zaznamenán v povrchových vodách ve vysokých koncentracích, až 580 ng.l^{-1} (Einsiedl a kol. 2010, Togola a kol. 2008) a také ve vodách podpovrchových (Morasch 2013). Chemické čištění v podobě

UV záření či ozonace, které může dramaticky přispět k biologické odbouratelnosti látek, může bohužel v případě diklofenaku vést k produktům s vyšší toxicitou (Sein a kol. 2008).

Kodein reprezentuje celou řadu látek, jejichž základem je morfinanový skelet. Jedná se jak o látky ze skupiny analgetik (Morfin, Hydrokodon, Oxykodon), antitusik (Kodein), tak i o narkotika užívaná jako drogy (Heroin, Acetylmorphine) a jejich blokátory (Naloxon). Výskyt těchto látek mezi ostatními farmaceutickými mikropolutanty v povrchových vodách je běžný (Fent a kol. 2006). Toxicita těchto látek je známá pro modelové skupiny organismů – jednobuněčná protozoa (Wu a kol. 1997), ryby, řasy (Gros a kol. 2010), atd. Také je známo, že může mít negativní důsledky na vývoj vyšších organismů (Williams a kol. 1991, Zuccato a kol. 2009). Na rozdíl od diklofenaku není kodein tak mediálně známý a dostupnost dat o jeho vlivu na životní prostředí je omezená. Stejně je to v případě vlastních mechanismů odbourávání.

Kyselina Mefenamová i přes své nežádoucí vedlejší účinky patří mezi 25 nejvíce využívaných léčiv v Británii, kde byla také vyhodnocena jako potenciální environmentálně škodlivá látka (Jones a kol. 2002). Byla zaznamenána její toxicita pro korýše a ryby (Kim a kol. 2009).

3.1.2 Látky morfinové řady

Látky morfinové řady jsou chemické sloučeniny alkaloidní povahy (obsahují ve své molekule bazický atom dusíku) a jejich strukturním základem je tzv. morfinanový skelet. V současné době je používáno více než 30 těchto látek jakožto aktivních farmak a několik dalších derivátů v podobě ilegálních drog. Výchozím zdrojem pro přípravu těchto látek bývají alkaloidy máku setého (*Papaver somniferum* L.) Morfin, Kodein a Tebain vyskytující se přirozeně jako součást opia. Existují i ryze syntetické látky morfinové řady, které jsou inspirované přírodními látkami a modifikují nebo vylepšují jejich vlastnosti. Takové látky v sobě nesou hlavně strukturní modifikace, které aktivují nebo naopak inhibují tzv. opioidní receptory. Biologické vlastnosti všech látek morfinové řady jsou závislé převážně na povaze substituentů morfinanovém skeletu a jsou detailně prozkoumány pouze pro humánní medicínu. Jedna z pionýrských prací vznikla již na počátku 19. století a vdčíme za ní německému chemikovi Friedrichovi Wilhelmu Adamovi Sertürnerovi, objeviteli morfinu (Klockgether-Radke 2002).

V mé práci se zabývám kodeinem, který je nejrozšířenější látkou morfinové řady a zdá se, že je i podstatným farmaceutickým mikropolutantem. Kodein tvoří chemicky odolná pentacyklická kostra, která obsahuje benzenový, dva cyklohexenové, piperidinový a furanový kruh. Tato struktura předurčuje kodeinu vysokou chemickou stabilitu a omezenou biologickou odbouratelnost. Ze struktury také vyplývá silně nepolární charakter a tedy omezená rozpustnost ve vodě (1:10000, w/v), ale lepší rozpustnost v organických rozpouštědlech.

3.2 Biotransformace a biotechnologické aplikace

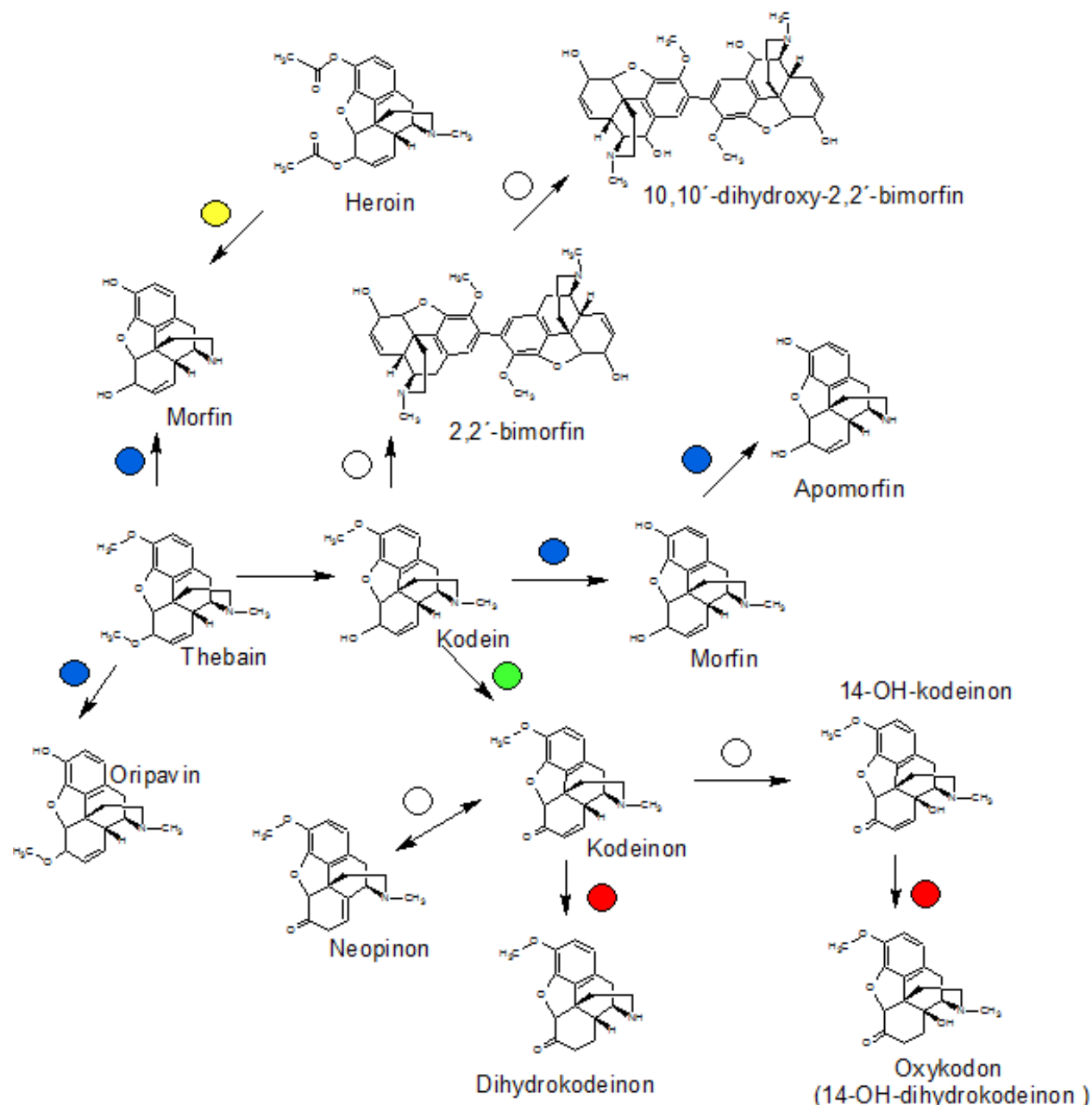
Biotransformace je obecný pojem zahrnující přeměnu jedné, výchozí látky v produkt za přispění živého organismu nebo jeho částí. V užším slova smyslu se biotransformací označují přeměny látek organismu či ekosystému nevlastních – xenobiotik. Tyto reakce mohou být využívány v podobě biotechnologických aplikací v tzv. zelené chemii (z angl. "Green chemistry"), kde nahrazují reakčně obtížný, finančně náročný nebo toxický krok chemické syntézy (H. Clark 1999). Na druhé straně dochází také k nežádoucím biotransformacím, které mohou modifikovat jinak neškodnou látku na vysoce toxický produkt. Studium mikrobiálních biotransformací je tedy nedílnou součástí studia osudu všech nežádoucích polutantů.

3.2.1 Známé biotransformační reakce látek morfinové řady

Pozměnění látek morfinové řady biotransformací je již více než 50 let předmětem mnoha výzkumů. Biotransformace byly popsány u hub jako například *Cunninghamella* (mukorovitě)(Chaudhary a kol. 2009) nebo askomycety *Cylindrocarpon* (Stabler a kol. 1998) a pro bakterie jako *Pseudomonas putida* M10 (Lister a kol. 1999, Long a kol. 1995), *Rhodococcus* sp. H1 (Cameron a kol. 1994) nebo *Bacillus* sp. (Madyastha 1998) .

Z chemického hlediska je mezi zaznamenanými biotransformacemi možné najít oxidační reakce alkoholů nejčastěji na uhlíku 6 přeměňující kodein či morfin na kodeinon či morfinon, redukci dvojnás vazby mezi uhlíky 7 a 8, deacetylaci, dealkylaci a také konjugaci dvou molekul morfinu za vzniku 2,2'-bimorfinu. Souhrnné schéma ukazující komplexnost (nikoliv detaily) dosud popsaných biotransformačních reakcí je ukázáno na obrázku č. 2. Enzymům,

kteřé katalyzují tyto reakce – morfin-6-dehydrogenáza, morfinon reduktáza, heroin esteráza a cytochromy P450 jsou věnovány následující odstavce a jejich struktura je pro vybrané zástupce ukázána na obrázku č. 3.



Obrázek č. 2 – Komplexnost biotransformačních reakcí morfinanového skeletu. Toto schéma vzniklo sloučením reakcí popsaných v následujících publikacích: (Abel a kol. 2003, Hailles a kol. 1993, Chaudhary a kol. 2009, Kunz a kol. 1985, Kyslíková a kol. 2013, Liras a kol. 1975, Madyastha 1994, 1994, Niknam a kol. 2010, Ramachandra Rao a kol. 1999, Stabler and Bruce 1998). Žlutý bod reprezentuje reakci katalyzovanou enzymem heroin esteráza, modrý bod reakce cytochromů P450, zelený bod reakce morfin-6-dehydrogenázy a červený bod morfinon reduktázy. Prázdný bod označuje reakce, které probíhají bez účasti enzymů, nebo jejich průběh není objasněn.

3.2.2 Enzym morfin-6-dehydrogenáza

Tento enzym katalyzující přeměnu kodeinu či morfinu na odpovídající keton byl popsán u velké škály organismů včetně člověka (Todaka a kol. 2005). Byla popsána také reakce zahrnující hydroxylový radikál, díky které může odpovídající keton vznikat chemickou cestou *in vivo* (Kumagai a kol. 1992) .

Z hlediska mikrobiální biotransformace byl velmi dobře popsán enzym z mikroorganismu *Pseudomonas putida* M10 (Bruce a kol. 1990, Walker a kol. 1996, 2000). Tento protein je monomerní s primární sekvencí 296 aminokyselin o celkové hmotnosti 32,1 kDa. K dispozici je i model enzymu (ProteinModelPortal: Q02198) získaný na základě homologního modelování pomocí struktury proteinu z *Mycobacterium smegmatis* (Scoble a kol. 2010). Její strukturní koordináty jsou uloženy v bance proteinových struktur Protein Data Bank s kódem: 2wzt a 2wzm. Enzym byl přiřazen do aldo-keto reduktázové rodiny a jeho struktura se vyznačuje $\beta 8/\alpha 8$ "barelovým" motivem (z angl. " $\beta 8/\alpha 8$ barrel motif").

Druhý popsáný enzym nesoucí morfin-6-dehydrogenázovou aktivitu je β -hydroxysteroidní dehydrogenáza *Pseudomonas testosteroni* (*Comamonas testosteroni*) (Liras a kol. 1975). Jak bylo pomocí enzymové kinetiky ukázáno, tento enzym má nižší aktivitu s morfinem než s přirozenými substráty (steroidní látky např. testosteron). β -hydroxysteroidní dehydrogenáza patří do rodiny dehydrogenáz s krátkým řetězcem, které jsou známé širokým substrátovým spektrem.

3.2.3 Morfinon reduktáza

Morfinon reduktáza je enzym katalyzující nasycení dvojné vazby mezi uhlíky 7 a 8 morfinanového skeletu. První morfinon reduktáza byla popsána opět u mikroorganismu *Pseudomonas putida* M10 (French a kol. 1995, 1996). Tento enzym byl přiřazen do rodiny starého žlutého enzymu (z angl.: "Old Yellow Enzyme", OYE). První zástupce byl izolován již v roce 1933 dvojicí Wartburg a Christian z kvasinek (Stott a kol. 1993). OYE jsou NAD(P)H dependentní dehydrogenázy, které nesou ve své molekule nekovalentně vázané FMN a katalyzují asymetrické dehydrogenace dvojných vazeb (Amato a kol. 2015). Jejich fyziologický substrát u bakterií není znám. Kromě morfinon reduktázy byl nalezen i další enzym z rodiny OYE schopný saturace dvojné vazby kodeinonu. Je jím glycerol trinitrát

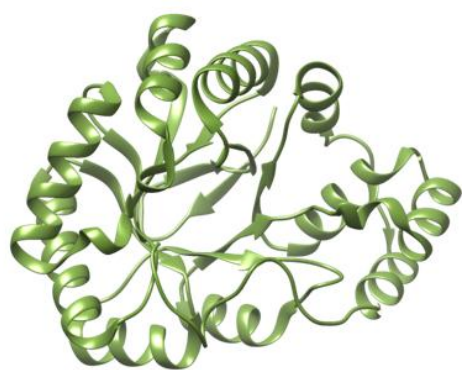
reduktáza XdpB z již zmiňovaného *Agrobacterium* sp. R89-1 (Uniprot A0A0A0VDJ9) (Zahradník a kol. 2016).

3.2.4 Heroin esteráza

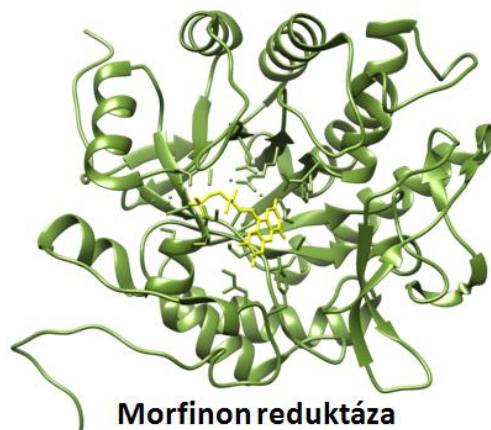
Tedy enzym zodpovědný za odstranění acetylové skupiny z hydroxylu 3 nebo 6 morfinu byl prvně identifikován u bakterie *Rhodococcus* sp. H1. (Cameron a kol. 1994), která byla kultivována na heroinu jako jediném zdroji uhlíku a energie. Enzym patřící mezi serinové hydrolázy je jednodoménný a nese také α,β —hydrolázový motiv typu 3. Jeho struktura je uložena v pdb pod označením 1lzl (Zhu a kol. 2003). Za zmínku stojí fakt, že enzym je používán v kombinaci s morfin-6-dehydrogenázou jako biosenzor umožňující rychlé stanovení užívání heroinu.

3.1.5 Cytochromy P450

Toto označení nese početná nadrodina proteinů (z angl. "superfamily") vyskytujících se ve všech doménách života včetně virů (Lamb a kol. 2009). Tyto enzymy jsou charakteristické přítomností molekuly hemu jako kofaktoru. Jejich jméno je odvozeno od spektrálních vlastností proteinu po redukci pomocí oxidu uhelnatého. Jedná se o oxygenázy schopné elektronového přesunu na široké spektrum substrátů. Kromě hydroxylací katalyzují dealkylační reakce. V případě látek morfinové řady se jedná o 3 a 6-O-dealkylace nebo 17-N-dealkylaci. Některé tyto reakce byly zaznamenány u hub (Chaudhary a kol. 2009), bakterií (Kunz a kol. 1985) i u vyšších organismů včetně člověka (Kobayashi a kol. 1998). Enzymy zodpovědné za katalytické aktivity však většinou nebyly izolovány a o jejich zapojení do biotransformací opiátů máme pouze nepřímé důkazy. Důkladnější znalosti máme o zapojení cytochromů P450 do biosyntetické dráhy morfinu v rostlinách (Frick a kol. 2007) a savčích buňkách (Kramlinger a kol. 2015).



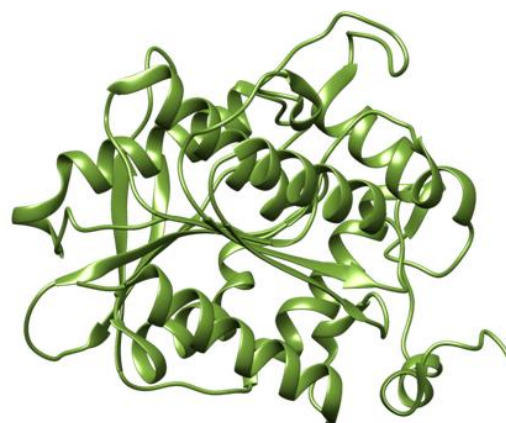
Morfin-6-dehydrogenáza



Morfinon reduktáza



Cytochrom P450



Heroin esteráza

Obrázek č. 3 – Struktura enzymů katalyzujících biotransformace látek morfinové řady.

Morfin-6-dehydrogenáza z *Mycobacterium smegmatis*, PDB kód 2wzm (Scoble a kol. 2010); Morfinon reduktáza z *Pseudomonas putida* M10, PDB kód 1gwj (Barna a kol. 2002); Heroin esteráza z *Rhodococcus* sp., PDB kód 1lzl (Zhu a kol. 2003); Cytochrom P450 z *Thermus thermophilus* HB27, PDB kód 1n97 (Yano a kol. 2003);

3.2.6 Katabolismus kodeinu

Kromě již popsaných biotransformačních reakcí na kodeinu nejsou dostupná data o kompletní bakteriální degradaci - mineralizaci kodeinu. Mineralizací je myšlen kompletní katabolický rozklad na jednoduché anorganické látky. Existuje studie, popisující transformace kodeinu aktivovaným kalem čistírny odpadních vod na několik jednodušších produktů, kde bylo zaznamenáno a zdokumentováno štěpení furanového a cyklohexenonového kruhu (Wick a kol. 2011). Kompletní degradační dráha je neznámá. V případě jednotlivých bakteriálních izolátů je známa schopnost *Pseudomonas putida* M10 růst na morfinu jako jediném zdroji uhlíku a energie (Bruce a kol. 1990) a také u bakterie *Rhodococcus* sp. H1 na heroinu (Cameron a kol. 1994).

3.3 Oxidační stres v bakteriích

Růst mikroorganismů v aerobním prostředí sebou nese vyšší energetické výtěžky z přijatých organických látek, ale není bez rizika. Reakce, ve kterých vystupuje kyslík jako reaktant, mohou poskytovat reaktivní vedlejší produkty jako superoxidový radikál (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylový radikál ($^{\bullet}OH$). Všechny tyto takzvané reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. "reactive oxygen species") mohou oxidovat buněčné biomolekuly a tím nenávratně modifikovat jejich strukturu. Teorie popisující vznik aerobního metabolismu dokonce uvažuje o situaci, kdy byly v anaerobním světě kyslík a jeho reaktivní radikály využívány jako toxin (Luo a kol. 2016) a imunitní buňky využívající ROS v boji s patogeny jsou dobrým příkladem analogie tohoto procesu v současnosti. S trochou nadsázky se dá říci, že kyslík byl v anoxygenní praatmosféře prvním environmentálním polutantem. Společně s tím jak v atmosféře narůstalo množství kyslíku, vznikala větší potřeba vyrovnat se s tímto stavem. Důsledkem této změny je kromě úpravy energetického metabolismu také celá řada procesů, která umožňuje se s kyslíkem, jeho reaktivními formami a modifikovanými biologickými molekulami vyrovnat. Kromě negativních účinků mohou reaktivní formy kyslíku hrát svou roli v řadě signalizačních procesů a dalších fyziologických pochodech (Cho a kol. 2009).

Největším zdrojem ROS v bakteriální buňce za optimálních fyziologických podmínek jsou nežádoucí jedoelektronové přechody v respiračním řetězci. V anglické literatuře je tento fenomén označován jako "single elektron leakage" a je zodpovědný za téměř 90 % produkce peroxidu vodíku (Gonzalez-Flecha a kol. 1995). Vznik dalších reaktivních forem kyslíku může být stimulován nejrůznějšími exogenními vlivy, jako jsou UV záření a ionizující látky. V případě, že koncentrace jednotlivých ROS překročí schopnost buňky se s nimi vyrovnat, dochází k oxidačnímu stresu.

3.3.1 Obranné mechanismy buňky proti oxidačnímu stresu

Obranné mechanismy jsou veškeré reakce, které vedou v buňce k zabránění vzniku oxidačního stresu nebo omezení jeho následků. Železo a další kovy jsou jedním z aktérů vzniku oxidačního stresu a mohou jeho negativní účinky dále potencovat. Na druhou stranu jsou kovy naprosto nezbytné pro růst bakteriální buňky jakožto součást metaloenzymů. Z tohoto důvodu musí být jejich příjem transportními systémy přísně regulován, stejně jako

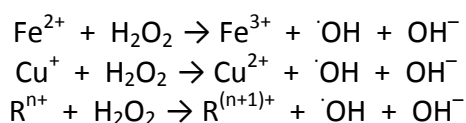
jejich osud v cytoplasmě. V případě bakterií má v cytoplasmě osud železa na svědomí dvojice proteinů – bakterioferritin a ferritin.

Dalším mechanismem, který zabraňuje vzniku oxidačního stresu, je udržování vnitrobuněčného redukčního prostředí pomocí antioxidantů jako jsou NADH, NADPH, askorbová kyselina, β -karoten, cystein a glutathion. Zvláště role glutathionu je velmi významná, protože jeho fyziologické koncentrace v buňce jsou vysoké. Se všemi těmito látkami jsou spojeny metabolické dráhy udržující je v přesně daném poměru mezi redukovanou a oxidovanou formou (Gill a kol. 2013).

Samostatnou kapitolou jsou mechanismy vedoucí k omezení následků oxidačního stresu. Jedná se o skupinu enzymů umožňující přímé snižování množství reaktivních forem kyslíku a k opravě produktů oxidace. Superoxid dismutázy jsou enzymy, které konvertují superoxid na peroxid vodíku a kyslík. Zajímavé je, že v *Escherichia coli* je exprese některých superoxiddismutáz regulována *fur* proteinem na základě intracelulární hladiny Fe^{2+} (Niederhoffer a kol. 1990). Regulačních mechanismů existuje ale velmi mnoho. Peroxid vodíku je velmi účinně rozkládán za vzniku vody a kyslíku pomocí rodiny peroxidáz a kataláz. Tyto enzymy jsou jedny z nejúčinnějších známých enzymů vůbec s vysokým číslem přeměny k_{cat} . Asi nejznámější systém na opravu produktů oxidace bílkovin je redukce disulfidových můstků pomocí thioredoxinu (Aslund a kol. 1999). Za zmínku stojí také metionin sulfoxid reduktáza redukující oxidovaný metionin (Trivedi a kol. 2015) nebo homolog feritinu Dps zabraňující poškození DNA (Grant a kol. 1998).

3.3.2 Fentonovy reakce

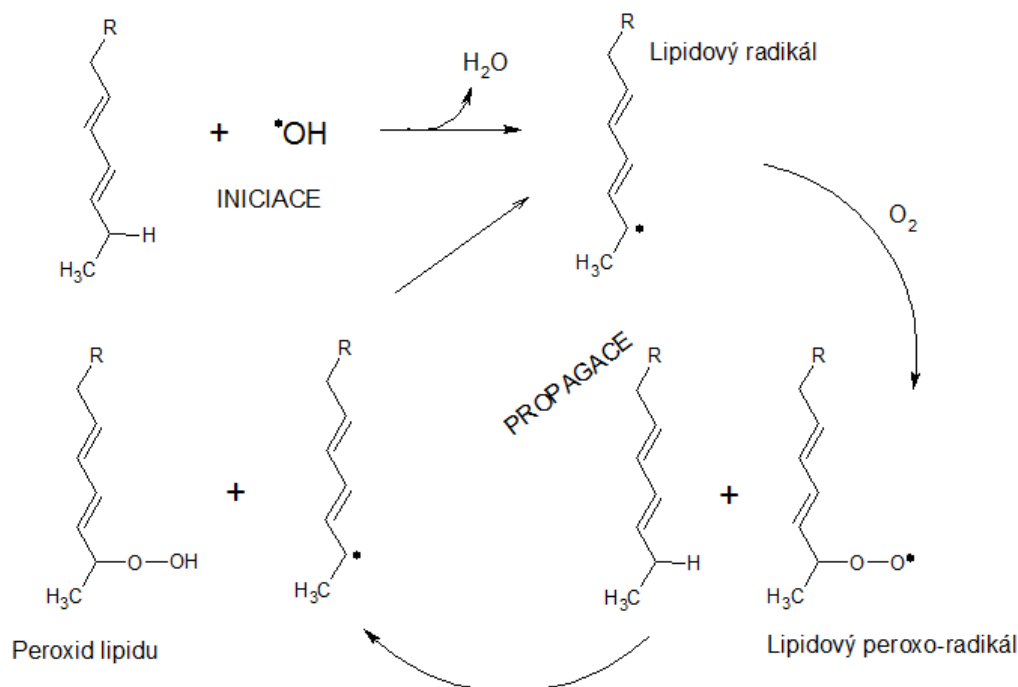
Roku 1894 publikoval Henry John Horstman Fenton článek o tom, že při reakci dvojmocných iontů kovů s oxidačními činidly vznikají mnohem reaktivnější činidla. V dnešní době chápeme Fentonovy reakce jako soubor reakcí, při kterých za katalýzy dvojmocnými ionty kovu dochází k oxidaci kovu a vzniku velmi reaktivních forem kyslíku, zvláště hydroxylového radikálu (Goldstein a kol. 1993). Na následujících řádcích jsou zapsány příklady typických Fentonových reakcí:



Fentonových reakcí ovšem existuje mnohem více a u některých je přesný reakční mechanismus stále předmětem výzkumu. K Fentonovým reakcím dochází *in vivo* v malé míře a jsou zdrojem ROS (Winterbourn 1995). Intracelulární koncentrace volných kovů je držena na velmi nízké koncentraci, tak aby byla produkce ROS pomocí Fentonových reakcí potlačena. V opačném případě je vysoká volná koncentrace dvojmocných iontů kovů v buňce akcelerátorem produkce reaktivních forem kyslíku. Tohoto fenoménu lze využít jako nástroje likvidace odolných a rezistentních bakterií (Vilcheze a kol. 2013). Generování vysoce reaktivních hydroxylových radikálů v *in vitro* systémech pomocí Fentonových reakcí může také najít uplatnění při likvidaci organických polutantů (De la Cruz a kol. 2013, Torrades a kol. 2014).

3.3.3 Peroxidace lipidů

Reaktivní formy kyslíku velmi snadno poškozují polynenasycené mastné kyseliny (Gueraud a kol. 2010). Důvodem pro tento fenomén je fakt, že radikál vzniklý z nenasycených sloučenin je stabilizován rezonancí, a tedy dále ochotně podléhá radikálovým reakcím (Mylonas a kol. 1999). Schéma radikálové peroxidace lipidů je ukázáno na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4 – Schéma radikálové peroxidace lipidů.

V prvním kroku vzniká lipidový radikál, který reakcí s kyslíkem umožňuje propagaci a dochází tak k poškození velkého množství molekul. Peroxidy mastných kyselin dále reagují a jsou štěpeny za vzniku α,β -nenasycených karbonylových sloučenin. Ty bývají průvodním znakem peroxidace lipidů. Kromě toho jsou α,β -nenasycené karbonylové sloučeniny vysoce reaktivní a vytvářejí Michaelovy adukty s buněčnými nukleofily např. glutathionem (Janowski a kol. 2003), což může vést k dalšímu poškození buňky. Z pohledu bakteriální buňky ale není peroxidace lipidů kritická, jako je tomu u eukaryotních organismů. Většina bakteriálních lipidů totiž není polynenasycená (Nichols a kol. 2002) a podléhá tedy peroxidaci podstatně méně (Bielski a kol. 1983). Přesto existuje evidence pro peroxidaci lipidů v bakteriích (*Escherichia coli* KS400) (Semchyshyn a kol. 2005).

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Bakteriální kmeny

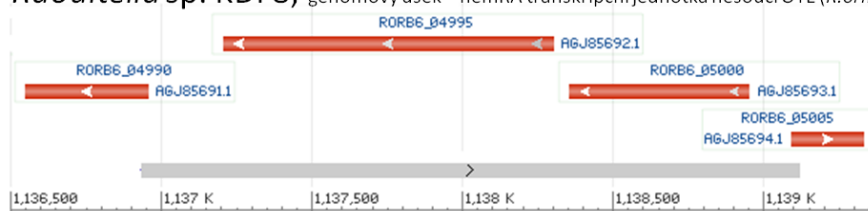
Bakteriální kmeny *Agrobacterium* sp. R89-1 (CCM 7949) a *Raoultella* sp. KDF8 (CCM 8678) byly izolovány v Laboratoři Enzymových Technologí MBÚ AVČR, v.v.i., a jsou uloženy v České sbírce mikroorganismů (CCM) Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Jako další byly v práci použity kmeny *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene, USA) a *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3) (Agilent, USA)

Plazmidy

Rekombinantní plasmid **p26XdpB** byl připraven inzercí genu kodujícího enzym XdpB (OYE) (Uniprot id: A0A0A0VDJ9) do pET26b přes restrikční štěpení pomocí enzymů *NdeI* a *XhoI*. Plazmidem byl transformován hostitel *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3). Příprava tohoto plazmidu je detailně popsána v příloze týkající se struktury a vlastností proteinu XdpB.

Plazmid **pRaoGFP** a plazmid **pAgroGFP** (Obr. 5 a 6) – tyto plazmidy nesou reportérové GFP, které umožňuje stanovit za daných podmínek exprese studovaného OYE proteinu *in vivo*. V zachované transkripční jednotce regulátor + gen je původní OYE nahrazeno reportérovým GFP. Vlastní pRaoGFP byl vytvořen rozsáhlou modifikací pMT plazmidu (ThermoFisher Scientific, USA), který byl štěpen restrikčními endonukleázami *KasI* a *Sall* za vzniku 2,5 kbp fragmentu nesoucího pUC ori a AmpR s regulačními oblastmi. Toto "jádro" vektoru bylo ligováno s genomovým fragmentem z *Raoultella* sp. KDF8. Plazmid pAgroGFP má stejný základ v plazmidu pMT, ale počátek replikace byl nahrazen pSa ori sekvencí z plazmidu pGreen. Stejně jako v případě plazmidu pRaoGFP byl tento fragment ligován s amplikonem z genomu *Agrobacterium* sp. R89-1. Na obrázku č. 5 je ukázáno schéma tohoto genomového fragmentu včetně identifikačních kódů pro jednotlivé sekvence (červeně). V závěrečném kroku byl u obou plazmidů nahrazen gen pro OYE fluorescenčním proteinem GFP pomocí metody bezrestrikčního klonování (z angl. "restriction free cloning"). Schéma finálního genomového fragmentu nesoucí reportérovou transkripční jednotku je ukázáno na obrázku č. 5 (modře). Schémata výsledných použitých plazmidů jsou na obrázku číslo 6.

Raoultella sp. KDF8; genomový úsek – nemRA transkripční jednotka nesoucí OYE (*R. ornithinolytica* B6)



Plasmid pRaoGFP



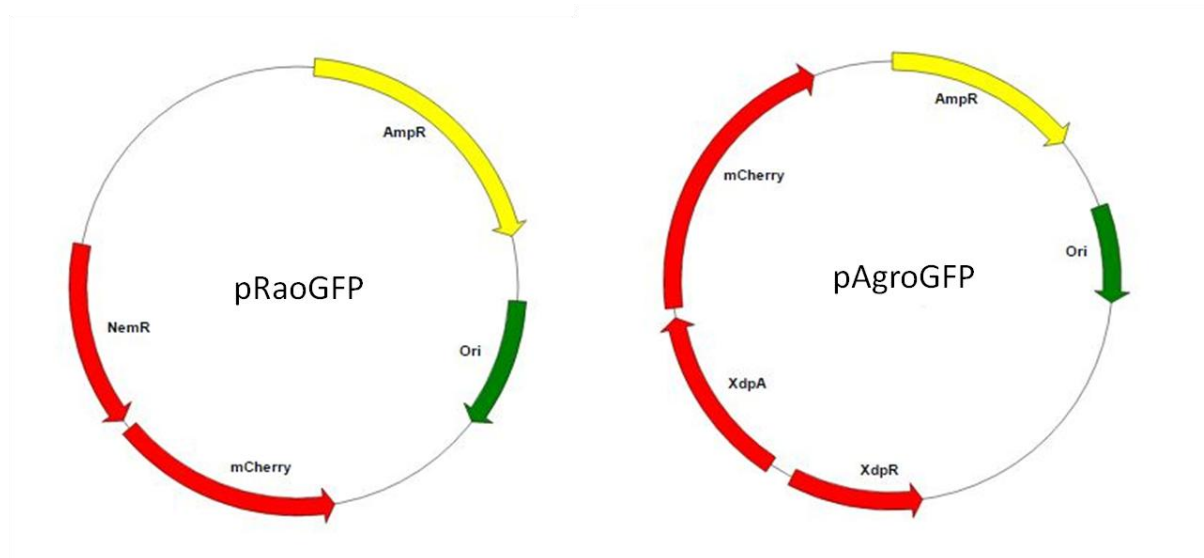
Agrobacterium sp. R89-1; xdpRAB transkripční jednotka nesoucí OYE (*R. ornithinolytica* B6)



Plasmid pAgroGFP



Obrázek č. 5 – Schéma transkripčních jednotek reportérových plazmidů pRaoGFP a pAgroGFP. Červeně jsou ukázána schémata transkripčních jednotek nemRA a xdpRAB. Šedý výsek vyznačuje oblast nesenou v plazmidu pRaoGFP. V případě plazmidu pAgroGFP je vložen celý zobrazený úsek. Modře je schematicky naznačena organizace genů v reportérovém plazmidu. Gen pro OYE je nahrazen reportérovým GFP. Negativní transkripční regulátory NemR a XdpR jsou vyznačeny včetně vazebných míst (dvě modré šipky). Černé šipky označují navazující sekvence plazmidu.



Obrázek č. 6 – Schematické reprezentace plazmidů pRaoGFP a pAgroGFP. Tyto plazmidové mapy byly vytvořeny pomocí webového nástroje Savvy Scalable Vector Graphics Plasmid Map (<http://www.bioinformatics.org/savvy/>).

Komerční enzymy

Benzonase®Nuclease (250U/ µl, Sigma Aldrich USA) – Nukleáza byla využívána pro snížení viskozity cytosolárních extraktů.

Křenová peroxidáza (typu IV, Sigma Aldrich, USA) – Peroxidáza je nezbytnou složkou stanovení pomocí Amplex® Red (kapitola 4.2.6).

4.1.2 Chemický materiál

Použité chemikálie

V této práci byly použity následující chemikálie, antibiotika a komponenty medií:

Název chemikálie (Zkratka)	Výrobce
2,2'-Bipyridyl	Sigma Aldrich, USA
2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma Aldrich, USA
2',7'-Dichlorofluorescein diacetát (Dcf_da)	Sigma Aldrich, USA
Acetonitril	Lach-Ner, ČR
Akrylamid	Sigma Aldrich, USA
Bisakrylamid	Sigma Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Merck, Německo
Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)	Sigma Aldrich, USA
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma Aldrich, USA
Etanol	Sigma Aldrich, USA
Fosforečnan disodný (heptahydrát) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Fosforečnan draselný KH_2PO_4	Sigma Aldrich, USA
Fosforečnan sodný (dekahydrát) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Glutathion	Sigma Aldrich, USA
Glycerol	Lach-Ner, ČR
Glycin	Sigma Aldrich, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma Aldrich, USA
Chlorid draselný KCl	Sigma Aldrich, USA
Chlorid kobaltnatý (hexahydrát) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Chlorid manganatý MnCl_2	Sigma Aldrich, USA
Chlorid sodný NaCl	Sigma Aldrich, USA
Chlorid vápenatý (dihydrát) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Imidazol	Sigma Aldrich, USA
Izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Enzo LifeSciences, USA
Kanamycin	Duchefa, Nizozemsko
Kvasinkový extrakt	Lennox, Irsko
Kyselina mravenčí (FA)	Sigma Aldrich, USA
LB Agar	Lennox, Irsko
LB Médium	Lennox, Irsko
L-Cystein	Sigma Aldrich, USA
Metyl metanethiosulfonát (MMTS)	Pierce, USA
Molybdenan sodný (dihydrát) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
N, N', N'- tetrametyletylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, USA

Peroxosíran amonný (APS)	Sigma Aldrich, USA
Síran hořečnatý (heptahydrát) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Síran manganatý (tetrahydrát) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Síran měďnatý (pentahydrát) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Síran zinečnatý (heptahydrát) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Síran železnatý (heptahydrát) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
Tris(2-carboxyethyl)fosfin (TCEP)	Sigma Aldrich, USA
Trizma báze	Sigma Aldrich, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Německo

Všechny chemikálie morfinové řady použité v této studii byly získány jako dar od Vývojového oddělení firmy Zentiva, a.s. Jedná se o tyto látky: kodein fosfát, morfin, kodeinon, morfinon, 14-OH-kodein, 14-OH-kodeinon, hydrokodon, oxykodon, oxymorfon, thebain, 7,8-dihydromorfin, 14-OH-morfinon a 14-OH-morfin.

Pozn.: Pouze kodein fosfát je rozpustný ve vodě. Ostatní substráty morfinové řady byly rozpouštěny v DMSO v poměru 1:20.

Komerční soupravy (kity)

Souprava pro stanovení peroxidu vodíku: Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Souprava pro stanovení volných thiolových skupin: Measure-IT Thiol Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.1.3 Ostatní materiál

Název materiálu	Výrobce
Dual Color Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, USA
Filtry 0,45 Millex®	Merck, Německo
HisPur™ Ni-NTA Resin	ThermoFisher Scient., USA
HPLC kolona: Phenomenex C18 250x 0,46 mm	Phenomenex, USA
Injekční stříkačky	Braun, Česká Republika
Kolona HiLoad 16/600 Superdex 200 PG	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolony Econo-Pac Chromatography Columns	Bio Rad, USA
Mikrostříkačka Hamilton SYR 50µl	Hamilton, USA
Mikrotitrační destička 96-jamková Nunc MicroWell Black96	ThermoFisher Scient., USA

4.1.4 Přístrojové vybavení

Název přístroje, typ a příslušenství	Výrobce
Analytická HPLC sestava Shimadzu UFLC, degasser DGU-20A5, liquid chromatograph LC-20AD, auto sampler SIL-20A HT, Column oven CTO-10AS VP, UV/VIS detector SPD-20A	Shimadzu, Japonsko
Analytické váhy Sartorius CPA225D	Sartorius, Německo
Centrifuga Allegra X-22R, rotory C0650, C1015	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti J-301, rotory JA-10, JA-30.50Ti, JLA-16.250	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Microfuge® 18	Beckman Coulter, USA
Centrifuga: Microfuge® 22R Centrifuge, rotor F241.5P	Beckman Coulter, USA
Denzitometr Ultrospec™ 10 Cell Density Meter	GE Healthcare, USA
Direct Detect® Infračervený Spektrometr	Merck, Německo
Elektroporační systém Gene Pulser Xcell™	BioRad, USA
Flow Box Clean-Air	Schoeler Instruments,
Hmotnostní spektrometr Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT- qIT)	Thermo Scientific, USA
Horizontální třepačka: IKA®Vortex Genius 3	IKA, Německo
Chromatograf NGC chromatography	BioRad, USA
Inkubátor: Max Q 4000, Barnstead Lab-Line	ThermoFisher Scient., USA
Konfokální fluorescenční mikroskop TCS SP5	Leica Microsystems, Německo
Magnetická míchačka IKA®RCT basic	IKA, Německo
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BioRad, USA
Multifunkční čtečka Clariostar Monochromator Microplate Reader	BMG, LABTECH, Německo
pH metr Orion Star A211	Thermo Scientific, USA
Předvážkové váhy Mettler PJ 600	Mettler, Švýcarsko
Sada pipet Finnpiptette F2	ThermoFisher Scient., USA
Spektrofotometr: Biowave II	Biochrom, UK
Termostatovaný blok: 17600 Dri-Bath	Thermolyne, USA
Termostatovaný inkubátor Memmert IPP 55	Memmert, Německo
Thermo cycler: C1000 Touch Thermal Cycler	BioRad, USA
Ultrazvuková rozbíjecí souprava: Sonicator 3000	Misonix, USA

4.2 Metody

4.2.1 Media a kultivace mikroorganismů

Escherichia coli XL-1 a *E. coli* ArcticExpress (DE3)

Kultivace buněk *E. coli* probíhala na standardním Luria-Bertani (LB) mediu zakoupeném již jako předpřipravená směs o složení (hmotnostní procenta): 1 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % NaCl. Hodnota pH byla upravena na 7 pomocí 0,5 M KOH a 1 M HCl při teplotě 25 °C.

Agrobacterium sp. R89-1

Pro kultivaci kmene R89-1 bylo použito Luria-Bertani medium obohacené o stopové prvky v množství: 200 mg.l⁻¹ . 7H₂O MgSO₄, 50 mg.l⁻¹ CaCl₂ . 2H₂O, 10 mg.l⁻¹ FeSO₄. Medium bylo připraveno jako standardní LB medium. Následně bylo medium sterilizováno autoklávováním a stopové prvky byly přidány do vychladlého media za dodržení sterility jako koncentrované zásobní vodné roztoky (100 ×).

Raoultella sp. KDF 8

Kultury mikroorganismu *Raoultella* byly pro experimenty související s oxidačním stresem kultivovány na LB mediu bez přídavku stopových prvků. Pro proteomickou komparativní studii bylo použito minerální medium BSBTE o složení: 1 % NaCl, 10 % K₂HPO₄, 7,5 % KH₂PO₄, 10 % NH₄Cl s upravením pH na hodnotu 6,7. Po sterilizaci media byly přidány stopové prvky: MgSO₄ . 7H₂O 200 mg.l⁻¹, CaCl₂ . 2H₂O 50 mg.l⁻¹, ZnSO₄ . 7H₂O 60 mg.l⁻¹, MnSO₄ . 4H₂O 17 mg.l⁻¹, FeSO₄ . 7H₂O 15 mg.l⁻¹, CoCl₂ . 6H₂O 50 mg.l⁻¹, CuSO₄ . 5H₂O 50 mg.l⁻¹, Na₂MoO₄ . 2H₂O 50 mg.l⁻¹.

Pevná média byla připravena doplněním tekutých medií 20 g agaru pro mikrobiologii (Difco) na 1 l media. Předem vyklávané médium s agarem bylo rozpuštěno zahřátím v mikrovlnné troubě a ponecháno opět zchladnout na teplotu 40 °C. Při této teplotě bylo přidáno antibiotikum a medium bylo následně sterilně rozlito do Petriho misky (Ø 8 cm) v souvislé vrstvě silné asi 4 mm. Po ztuhnutí byly předsušeny a použity nebo dále skladovány při 4 °C. U kmenů nesoucích plazmid byla používána odpovídající selekční antibiotika (kanamycin 60 mg.l⁻¹ nebo ampicilin 100 mg.l⁻¹). Pro biotransformační a metabolomické

pokusy byla media dále obohacena o substrát/zdroj uhlíku a energie (kodein, kodeinon, glycerol, etanol).

Ke kultivaci v tekutém mediu byly využity Erlenmeyerovy baňky o různých objemech (100, 250, 1000 a 5000 ml) s mediem odpovídajícím 1/5 celkového objemu baňky. Vlastní kultivace probíhala v třepaných kulturách při 220 otáčkách za minutu (rpm, z angl. "rotations per minute") v inkubátoru Max Q 4000. Tento postup je společný všem kultivovaným mikroorganismům. Teplota byla zvolena s ohledem na optimální růstové podmínky: kmeny *Escherichia coli* 37 °C, *Agrobacterium* sp. R89-1 28 °C a pro kmen *Raoultella* sp. KDF-8 30 °C. Kultivace na pevném mediu probíhala za dodržení stejných teplot.

4.2.1 Příprava kompetentních buněk a transformace

Příprava kompetentních buněk pro transformaci teplotním šokem

Vybraný bakteriální kmen (*E. coli* XL-1, ArcticExpress (DE3) nebo *Raoultella* sp. KDF8) byl kultivován v 5 ml LB media (30 °C, 250 rpm) po dobu 12 h. Narostlou bakteriální kulturou bylo inokulováno 50 ml média A (2 % inokulum). Růst kultury byl monitorován, až do dosažení optické hustoty hodnoty $OD_{600}=0,4$, pomocí přístroje Ultrospec™ 10 Cell Density Meters (GE Healthcare, USA). Následně byla kultura zchlazena na ledu po dobu 10 minut a buňky byly separovány centrifugací (5000 g, 15 min, 4 °C). Buněčný pelet byl resuspendován v 0,5 ml média A a doplněn o 2,5 ml média B. Takto připravené buňky byly pipetovány po 100 µl do sterilních mikrozkuvek a okamžitě zmrazeny pomocí tekutého dusíku. Kompetentní buňky byly skladovány při – 80 °C.

Medium A: LB médium doplněné o 10 mM $MgSO_4$ a 0,2 % (w/v) glukózu

Medium B: LB médium doplněné o 36 % glycerol, 12 % PEG (MW 8000) a 12 mM $MgSO_4$.

Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci

Buňky kmene *Agrobacterium* sp. R89-1 byly kultivovány 48 h v LB mediu (28 °C, 200 rpm) do pozdní stacionární fáze. Touto kulturou bylo inokulováno 50 ml LB media a kultivováno za stejných podmínek do $OD_{600}=0,5$. Buňky byly separovány centrifugací (5000 g, 15 min, 4 °C), resuspendovány v 10 % glycerolu a tento proces byl ještě jednou zopakován. Výsledná buněčná suspenze byla zmrazena po 100 µl v tekutém dusíku a uchovávána při -80 °C.

Transformace kompetentních buněk teplotním šokem

K 100 μ l kompetentních buněk (*E. coli* ArcticExpress (DE3) nebo *Raoultella* sp. KDF8) bylo přidáno 2 μ l plazmidové DNA (koncentrace). Buňky byly inkubovány po dobu 30 minut na ledu. Poté byl proveden teplotní šok umístěním buněk na 45 s do teploty 42 °C v termostatovaném bloku. Teplotní šok pro mikroorganismus *Raoultella* sp. KDF8 byl proveden při snížené teplotě 35 °C. Po této proceduře byly buňky opět rychle zchlazeny na 0 °C umístěním v ledové lázni po dobu 5 minut. K takto ošetřeným buňkám bylo přidáno 500 μ l LB media a buňky byly inkubovány po dobu 60 minut v 37 °C (28 °C kmen KDF8) před následným vysetím na pevné medium.

Transformace elektrokompetentních buněk *Agrobacterium* sp. R89-1 pomocí elektroporace

Tato metoda byla zvolena jako jednoduchá alternativa k transformaci teplotním šokem z důvodu vyšší efektivity pro *Agrobacterium* sp. R89-1. Principem metody je vytvoření transientních pórů v buněčné membráně pomocí krátkého intenzivního elektrického pulsu.

Předem připravené elektrokompetentní buňky byly rozmrazeny a smíchány s 0,5 μ l plazmidové DNA (0,05 - 0,1 μ g). Polovina připraveného množství byla pipetována do předem vychlazené elektroporační kyvety (0,2 mm) a elektroporována na přístroji Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (Bio-Rad, 2.0 kV, 200 Ω , 25 μ F). Elektroporované buňky byly ihned smíchány s 500 μ l LB media, inkubovány po dobu 60 minut v 28 °C a následně vysety na pevné LB medium s ampicilinem.

4.2.2 Heterologní exprese proteinu XdpB

Protein XdpB byl heterologně exprimován v buňkách *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3) pomocí již dříve připraveného plazmidu p26XdpB a dále používán na experimenty s autooxidační reakcí kodeinonu.

Erlenmeyerova baňka s 50 ml LB media byla inokulována kulturou *E. coli* ArcticExpress (DE3)(p26XdpB) narostlou na pevném mediu LB s kanamycinem a kultivována 12 h při 37 °C na třepačce (220 rpm). Tato kultura sloužila jako inokulum produkční kultury (2 % inokulum). Produkční kultura byla kultivována za teploty 30 °C do hodnoty $OD_{600} = 0,8$ a následně byla snížena kultivační teplota na 10 °C. Exprese proteinu byla indukována přidáním IPTG

ve finální koncentraci 1 mM. Po indukci kultivace probíhala po dobu 24 h a následně byly buňky odděleny centrifugací (8000 g, 10 min, 4°C) a uschovány v mrazáku (-20 °C).

4.2.3 Chromatografické metody

Chromatografické metody byly využívány k purifikaci proteinu XdpB a ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení produktů biotransformace.

Purifikace proteinu XdpB

Buňky s nadprodukovaným XdpB získané v kapitole 4.2.2 byly dezintegrovány pomocí ultrazvuku. Suspenze buněk (10 % vlhké hmotnosti buněk ww/v, z angl. "wet weight/volume") v pufru 50 mM Tris 200 mM NaCl, pH 8,0 byla umístěna do zařízení Sonicator 3000 na ledové lázni. Přístroj byl nastaven na amplitudu 2,5 s průměrným výkonem 14 W. Sonikační protokol v celkové délce 15 minut sestával z opakování cyklu 20 s sonikace a 40 s pauzy. Nerozbité buňky a jejich části byly odstraněny centrifugací (9000 g, 10 min, 4 °C). Výsledný roztok byl ošetřen nukleázou *Benzonase*[®]**Nuclease** (250U/μl, Sigma) pro snížení celkové viskozity vzorku. Takto připravený vzorek (cytosolární extrakt) byl podroben prvnímu chromatografickému kroku založenému na niklové chelatační chromatografii. Principem této afinitní chromatografie je schopnost hexahistidinové kotvy přítomné na N-konci XdpB (z angl. "His Tag", celá sekvence u proteinu XdpB: GSSHHHHHSSGLVPRGSH) vázat Ni²⁺ pomocí koordinačně-kovalentních vazeb. Vzorek byl ručně nanesen na Econo-Pac kolonku (Bio-Rad, 20 °C) obsahující 5 ml chromatografické matrice Ni-NTA Agarose (Invitrogen). Následně byla kolonka promyta 10 objemy kolony (CV, z angl.: column volume) puftrem: 50 mM Tris 200 mM NaCl 10 mM Imidazol, pH 8,0. Finální eluce byla prováděna 5 CV pufru: 50 mM Tris 200 mM NaCl 200 mM Imidazol, pH 8,0. Pro další purifikační krok založený na gelové permeační chromatografii bylo využito 5 ml elučních frakcí s nejvyšším obsahem XdpB. Obsah XdpB byl stanoven spektrofotometricky. Protokol stanovení je popsán detailně v kapitole 4.2.5. Gelová chromatografie byla provedena na střednětlakém kapalinovém chromatografu NGC Bio-Rad (z angl. "Fast protein liquid chromatography") při 15 °C. Použitá kolona Superdex 75 16/600 (GE Healthcare) byla nejprve ekvilibrována purifikačním puftrem (20 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,5) do konstantní odpovědi spektrofotometrického a konduktivitního detektoru (cca 90 min)

a až poté využita na vlastní chromatografii. Frakce odpovídající XdpB byly sloučeny, byla stanovena jejich koncentrace a jako zásobní vzorky byly po 100 µl uchovávány v -80 °C.

Stanovení biotransformačních produktů kodeinu pomocí HPLC s reverzní fází

Stanovení biotransformačních produktů kodeinu bylo prováděno, v kultivační kapalině či biotransformačním pufru (fosfátový pufr PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·2 H₂O, 2 mM KH₂PO₄), pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC (z angl. "High Performance Liquid Chromatography"). Vzorky byly zbaveny buněk a jejich fragmentů centrifugací (20 000 g, 15 min, 25 °C). Následně bylo 400 µl roztoku extrahováno pomocí 800 µl směsi 3 : 1 terc-butylmetyléteru (TBME) s roztokem amoniaku (NH₄OH). Extrakce probíhala po dobu 20 minut na horizontální třepačce (200 rpm). Éterová frakce byla oddělena centrifugací (1 000 g, 10 minut, 25 °C), přenesena do čisté mikrozkušavky Eppendorf a odpařena pomocí evakuovaného exsikátoru. Získaný odparek byl rozpuštěn v mobilní fázi: 20 % Acetonitril, 79,4 % ultračistá voda, 0,2 % TFA, 0,4 % NH₄OH. Analýza probíhala za izokratických podmínek na HPLC sestavě Shimadzu UFLC: průtoková rychlost 1 ml.min⁻¹, kolona Phenomenex C18 250×0,46 mm, teplota kolony 40°C a on-line detekce pomocí diodového detektoru (z angl. "diode-array") při rozpětí vlnových délek 180 – 400 nm. Analýza výsledků byla provedena metodou standardního přídatku. Vzorky byly stanovovány v triplicátech. Podmínky analýzy vedou k postupnému zhoršování vlastností kolony tzv. stripování. Z tohoto důvodu byla každá analýza samostatně kalibrována na referenční substráty. Retenční časy substrátů: dihydromorfin 2,7 min, morfin 3,5 min, morfinon 4,5 min, 14-OH-morfinon 4,7 min, kodein 8,8 min, dihydrokodein 6,0 min, 14-OH-kodein 5,5 min, 14-OH-kodeinon 12,0 min, 14-OH-dihydrokodein 5,3 min, 14-OH-dihydrokodeinon 11,3; Vyhodnocení obsahu vrcholů na chromatogramu bylo provedeno v programu LC Solutions (Shimadzu).

4.2.4 Elektroforetické metody

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Tato elektromigrační metoda využívá záporně nabitého detergentu dodecylsulfátu sodného pro denaturaci a udělení náboje proteinům, které jsou separovány podle velikosti v polyakrylamidovém gelu. Metody bylo používáno pro stanovení čistoty preparátu enzymu

XdpB. Provedení metody respektuje standardní Tris-glycinové uspořádání dle Laemmliho (Laemmli 1970). Využíván byl 12 % separační gel o složení: 1,66 ml 30 % akrylamid + 0,8 % bisakrylamid, 1,87 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 1,38 ml H₂O (deionizované), 50 µl 10 % SDS, 12,5 µl 25% APS a 12,5 µl TEMED a zaostřovací gel o složení: 0,266 ml 30 % akrylamid + 0,8 % bisakrylamid, 0,2 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8), 1,23 ml H₂O (deionizované), 60 µl 10 % SDS, 20 µl 25 % APS a 5 µl TEMED. Gel byl připravován pomocí soupravy Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Proteinový vzorek byl před nanesením na gel smíchán se vzorkovacím pufrem v poměru 5 : 1 a byl denaturován při 95 °C po dobu 5 minut. Složení vzorkovacího pufru: 2 % (w/v) SDS, 10 % glycerol, 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,01 % (w/v) Bromfenolová modř, 5 % β-merkaptoetanol. Elektroforéza probíhala v prostředí Tris-glycinového pufru o složení: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS po dobu cca 90 minut při 120 V. Jako standard molekulových velikostí byl použit komerčně dostupný 'Precision Plus Protein All Blue Prestained Standards' (Bio-Rad). Výsledek elektroforézy byl po jejím skončení vizualizován barvením pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 (Pink a kol. 2010).

4.2.5 Spektrofotometrické metody

Stanovení koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové

Tato metoda využívá barevné změny redukováného barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 v přítomnosti proteinů z červeno-hnědé barvy na světle modrou. Tuto změnu absorbance je možné snadno stanovit pomocí spektrofotometru při 595 nm. Jako standard proteinových koncentrací byl využit hovězí sérový albumin. Ze získané kalibrační přímky (lineární kalibrace) bylo možné kvantifikovat neznámý vzorek proteinu. Nevýhodou této metody je změna odpovědi barviva v závislosti na složení proteinu – barevnou změnu působí interakce s bazickými a hydrofobními residui. Z tohoto důvodu byla metoda využívána spíše pro orientační stanovení.

Stanovení koncentrace proteinu v infračervené oblasti spektra pomocí spektrometru DirectDetect (Merck)

Tento přístroj umožňuje přesně stanovit absorbanci v oblasti 1650 cm⁻¹ a 1550 cm⁻¹ (amidový pás I a II), které jsou charakteristické pro absorpci peptidové vazby. Vlastní stanovení probíhá nanesením 2 µl vzorku na terč měřicí karty. Vzorek je vysušen a je

stanoveno jeho absorpční spektrum. Porovnáním absorpce peptidových pásů se standardem je možné vzorek snadno kvantifikovat. Přístroj má interní kalibraci na BSA.

Stanovení rychlosti Michaelovy reakce mezi kodeinonem a glutathionem

Toto stanovení bylo provedeno fluorimetricky pomocí Measure-IT™ Thiol Assay Kit. Detailní popis metody je v kapitole 4.2.6 - Stanovení thiolů v buňce pomocí komerční soupravy Measure-IT™ Thiol Assay Kit. Vlastní měření bylo provedeno reakcí redukovaného glutathionu o výsledné koncentraci 10 μM s kodeinonem či 14-OH-kodeinonem o stejné koncentraci. Do jamek 96 jamkové destičky (Nunc™ F96 MicroWell™ Black) bylo pipetováno 80 μl PBS pufru + 10 μl koncentrovaného vzorku glutathionu + 10 μl vzorku α,β -nenasyceného ketonu. Probíhající Michaelova adice byla zastavena přidáním 100 μl fluorescenčního činidla, které okamžitě (10 s) inaktivuje zbylé volné SH skupiny. Výsledek byl odečten změřením fluorescence vzorku na multikanálové čtečce CLARIOstar (BMG Labtech).

4.2.6 Metody studia oxidačního stresu

Stanovení peroxidu vodíku v buňkách pomocí Amplex® Red

Sloučenina 10-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin (Amplex® Red) reaguje s peroxidem vodíku ve stechiometrickém poměru 1 : 1 za katalýzy peroxidázou. Produktem reakce je resorufin, látka vykazující silný fluorescenční signál s excitací při 570 nm a emisí při 585 nm. Oproti resorufinu výchozí Amplex red nevykazuje žádné fluorescenční vlastnosti. Měřením fluorescence vznikajícího resorufinu je tedy možné stanovit vznikající peroxid vodíku. Rizikem tohoto stanovení je interference s NADH, autooxidací glutathionu a fotooxidace (Mishin a kol. 2010). Z tohoto důvodu bylo stanovení pomocí Amplex red použito pouze v *in vitro* systému tak, aby bylo možné tyto vlivy omezit.

Vlastní měření bylo provedeno v 96 jamkové destičce pro fluorescenční měření (Nunc™ F96 MicroWell™ Black) ve dvou pufračních systémech (20 mM Tris pH 8,0; 50 mM K_2HPO_4 pH 8,0 (KPi)) a destilované vodě. Testován byl vliv dvoumocných iontů kovů (Mg^{+2} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+}) v koncentracích 0,1 a 1 μM společně s 50 μM Amplex red a 0,1 U/ml křenové peroxidázy. Pro kvantifikaci byla připravena standardní křivka z peroxidu vodíku o koncentracích 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 a 10,0 μM . Vliv saturace dvojné vazby pomocí morfinon reduktázové reakce byl studován přidávkou purifikovaného XdpB 0,1 mg a 2 mM NADH.

Vliv interference NADH s reakcí byl respektován dle dostupné literatury (Votyakova a kol. 2004). Měření intenzity fluorescence a měření závislosti intenzity fluorescence na čase byla provedena na fluorescenční čtečce CLARIOstar (BMG Labtech) s excitací při 530 nm.

Stanovení intracelulární produkce ROS pomocí 2',7'-Dichlorofluorescein diacetátu (Dcf-da)

Toto stanovení využívá schopnosti látky 2',7'-dichlorofluorescein diacetátu prostupovat do buněk bez nutnosti přenašečových molekul. Vnitrobuněčné esterázy provedou deesterifikaci látky za vzniku 2',7'-dichlorofluorescinu, který nemá žádné fluorescenční vlastnosti, ale je velmi citlivý na oxidaci pomocí ROS (Hempel a kol. 1999, Rastogi a kol. 2010), zvláště pak pomocí H_2O_2 (Myhre a kol. 2003). Tato oxidace přemění fluorescein na 2',7'-dichlorofluorescein, který vykazuje silnou fluorescenci s excitačním maximem v 510 nm a emisí při 540 nm. Rizikem této fluorescenční sondy je její deacetylace před vstupem do buněk (v bakteriální periplasmě) a tedy měření signálu, který neodpovídá oxidačnímu prostředí v buňkách (Halliwell a kol. 2004).

Měření pomocí Dcf-da mohou být dále modifikována tak, aby poskytovala další informace o procesech souvisejících s oxidačním stresem. Na potlačení Michaelovy adice je možné k měřené suspenzi přidat glutathion. Thiomočovina se přidává jako 'zhášec' (z angl. "scavenger") hydroxylových radikálů (*in vivo*), čímž dojde k zabránění jejich vlivu na celkový oxidační stres (Araujo a kol. 2001). V *in vivo* experimentech lze také využít chelatační činidlo 2,2'-bipyridyl, který omezí vliv hlavně Fe^{2+} iontů (de Léséleuc a kol. 2012, Liu a kol. 2012).

Pro měření byly využity sterilní 96 jamkové destičky (Nunc™ F96 MicroWell™ Black) s pracovním objemem 300 μ l (maximum) a čtečka CLARIOstar (BMG Labtech, citlivost 1000). Předem kultivované buňky byly resuspendovány v PBS pufru za vzniku 10 % ww/v buněčné suspenze. Do měřených jamek bylo pipetováno 200 μ l buněčné suspenze, roztok Dcf-da (výsledná koncentrace 20 μ g/ml) a substráty sledovaných reakcí 1mM kodein, kodeinon, 14-OH-kodeinon. Ovlivnění reakce bylo testováno s glutathionem o výsledných koncentracích 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; thiomočovinou 100, 200, 500 1000 μ M; a 2,2'-bipyridylem 10, 20, 50, 100, 500 μ M. Všechny pokusy byly prováděny v 5 paralelních jamkách ve třech nezávislých provedeních.

Stanovení thiolů v buňce komerční soupravou Measure-IT™ Thiol Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

Souprava obsahuje činidlo, které reaguje s thiolovými skupinami cysteinu a glutathionu za vzniku fluorescečního aduktu s excitačním maximem 490 nm a emisním maximem při 520 nm. Díky stanovení volných thiolů je možné charakterizovat redoxní potenciál buňky a také dopad Michaelovy adice kodeinonu na volné thioly. Nebezpečí metody je oxidace a thiol-disulfidová výměna během přípravy vzorku (Hansen a kol. 2009). K zabránění těmto pochodům se využívá 10 % kyselina trichloroctová. Ta způsobuje také precipitaci proteinů a zajistí tak, že dochází ke stanovení volných thiolů v glutathionu a volného cysteinu.

Kalibrační křivka byla připravena ředěním redukovaného glutathionu deionizovanou vodou na výsledné koncentrace 0; 0,55; 1,1; 2,2; 4,4; 6,6; 8,8; 11 μM . K měření byly využity 96 jamkové destičky (Nunc™ F96 MicroWell™ Black). Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 80 μl PBS pufru + 100 μl reakčního činidla (100 \times ředěné) a 20 μl kalibračního vzorku. Obsah jamky byl důsledně promíchán nasátím a vypuzením kapaliny z pipety (nejméně 5 \times). Fluorescence byla odečítána na čtečce CLARIOstar (BMG Labtech) s citlivostí 800.

Buňky kmenů R89-1 a KDF8 byly kultivovány na LB mediu do pozdní stacionární fáze (48 h), dále byly buňky separovány centrifugací (5000 g, 10 minut, 25 °C) a resuspendovány v čistém LB mediu na $\text{OD}_{600}=5,0$. Vzorky byly odebírány po 2 h počáteční inkubace (28 °C, 220 rpm) v časech 0 a 5, 10, 15, 30, 60, 90 a 120 minut po přidání kodeinonu (1 g.l^{-1}) či 14-OH-kodeinonu (1 g.l^{-1}). Poslední vzorek byl odebrán druhý den po 12 hodinách od přidání substrátů. Vzorek – 1 ml buněčné suspenze byl centrifugován (18 000g, 3 min, 25 °C), supernatant byl odstraněn pipetou a pelet byl resuspendován v 10 % kyselině trichloroctové. Takto připravený vzorek byl zamražen v -20 °C do analýzy (12 h). Předchozím stanovením se standardem bylo ověřeno, že v této době nedojde ke změně výsledků vyšší než 3 %. Rozmražený vzorek byl opět centrifugován za účelem odstranění precipitovaných proteinů (18000 g, 15 min, 25 °C). Supernatant (500 μl) byl odebrán pipetováním do čisté mikrozkuhavky Eppendorf. K tomuto množství bylo pipetováno 50 μl 5M NaOH k neutralizaci kyseliny trichloroctové. Z připraveného vzorku bylo odebíráno 20 μl na stanovení volných thiolových skupin. Složení reakční směsi bylo stejné jako v případě standardů: 80 μl PBS pufru + 100 μl reakčního činidla (100 \times ředěné). Obsah jamky byl důsledně promíchán a byla odečtena fluorescence na čtečce CLARIOstar (BMG Labtech,

citlivost 800). Všechna stanovení byla provedena v 5 paralelních jamkách (technické replikáty) a třech nezávislých stanoveních.

Stanovení exprese OYE *in vivo* pomocí reportérových plazmidů pRaoGFP a pAgroGFP

Bakteriální kmen transformovaný reportérovým plazmidem byl kultivován na LB mediu do stacionární fáze. Buňky byly separovány centrifugací (5000 g, 10 min, 20 °C) a resuspendovány v čerstvém LB mediu tak, aby vytvořily 10 % buněčnou suspenzi (ww/v). Měření probíhalo ve sterilních 96 jamkových destičkách (Nunc™ F96 MicroWell™ Black) s pracovním objemem 300 µl (maximum). Do jamek bylo pipetováno 200 µl suspenze buněk a substrát (1 mM kodein či kodeinon). Jako pozitivní kontroly bylo využito 0,1 mM peroxidu vodíku. Fluorescence byla odečítána v čase na čtečce CLARIOstar (BMG Labtech) s excitací při 580 nm a emisním filtrem nastaveným na 620 nm (citlivost 2000).

4.2.7 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie je metoda fluorescenční mikroskopie, kdy dochází ke zvýšení kontrastu odfiltrováním vlivu paprsků, které vycházejí z mikroskopického preparátu pod a nad rovinou pozorování. Dochází tedy k zaostření pouze jedné roviny v pozorovaném vzorku. Metoda byla použita na ověření lokalizace signálu z ROS sondy (Dcf_{da}).

Pro pozorování buněk s indukovaným oxidačním stresem byly použity stacionární buňky *Agrobacterium* sp. R89-1 (10 % suspenze buněk ww/v), které byly preinkubovány s 2',7'-dichlorofluorescein diacetátem 20 µg/ml a 1 mM kodeinonem po dobu 6 hodin při 28 °C. Po uplynutí preinkubační doby byly buňky zbaveny media a promyty v pufru PBS. Promyté buňky (2 µl) byly smíchány s 2 µl vzorkového média (z angl. "mounting medium") ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific). Konfokální snímky byly pořízeny na mikroskopu TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) s imerzním objektivem (APO 100x 1.40 Oil) za pokojové teploty pomocí 405 nm diodového laseru (30 mW; excitace 411 a emise 480 nm) a 488 nm argonového laseru (25 mW; excitace 508 a emise 522). Výsledné snímky byly upraveny v softwaru Adobe Photoshop.

4.2.8 Metody hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda umožňující analýzu molekul na základě jejich hmotnosti a náboje. Veškeré práce, vyjma analýzy dat, zahrnující hmotnostní spektrometrii byly provedeny jako servisní, ve spolupráci s Laboratoří hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké Fakulty UK. Jejich popis je z tohoto důvodu simplifikován.

Identifikace aduktů kodeinonu na volné cysteiny proteinů

Tato identifikace probíhala na úrovni celého proteomu buněk *Agrobacterium* sp. R89-1, které byly preinkubovány s 1 g.l^{-1} kodeinonu po dobu 6 h. Buňky byly dezintegrovány a v PBS pufru s přídavkem 2 % deoxycholátu sodného. Nerozpustný zbytek byl odstraněn centrifugací (20 000 g, 10 min, 4 °C). Vzorek obsahující 200 µg proteinu byl redukován pomocí 5 mM TCEP (60 °C, 60 min) a blokován pomocí 10 mM MMTS (10 min, 25 °C). Takto modifikované a nemodifikované vzorky o stejné koncentraci byly podrobeny trypsinovému štěpení v poměru trypsin/protein = 1/100. Vzorek byl štěpen přes noc a následně byl odsolen na kolonce Michrom C18 colum. Výsledný vzorek obsahující peptidy (2 µg) byl injikován na kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RSLCnano system (Thermo Scientific - Dionex) kombinovaný s hmotnostním detektorem TripleTOF 5600 MS + NanoSpray III (AB Sciex). Samotná separace peptidů proběhla na koloně Acclaim PepMap100 analytical column (3 µm, 15 cm×75 µm ID, Thermo Scientific) s předkolonkou PepMap100 column (5 µm, 2 cm×100 µm ID, Thermo Scientific) pomocí 70 minutového lineárního gradientu 5 až 60 % roztoku B (roztok A: 2 % AcN, 0,1 % kyseliny mravenčí (FA); roztok B: 80 % AcN, 0,1 % FA). Získaný záznam byl vyhodnocen v programu AB SCIEX MS Data Converter a odpovídající peptidy byly hledány proti databázi *in silico* vzniklých triptických štěpů pomocí programu Mascot 2.2. Detailně byly hledány cysteinové modifikace s hmotností M_w 297.35, 296.35, a 295.35 odpovídajícím adici kodeinonu.

Kvantitativní proteomická analýza

Buňky mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 byly kultivovány na BSBTE mediu s glycerolem (1 g.l^{-1}), BSBTE mediu s kodeinem (1 g.l^{-1}) do pozdní exponenciální fáze (18 a 24 h). Buňky *Agrobacterium* sp. R89-1 ve stacionární fázi (48 h) byly resuspendovány v PBS pufru (10 % ww/v suspenze) obsahujícím glycerol nebo kodein ve stejných koncentracích (1 g.l^{-1}) a byly

inkubovány 6 h (28 °C, 200 rpm). Vzorky buněk (5 ml) byly dezintegrovány (protokol postupu v kap. 4.2.3), rozpuštěny v PBS pufru s 2 % deoxycholátem sodným a byla stanovena jejich přesná koncentrace. Vzorek obsahující 200 µg proteinů byl redukován, volné thiolby byly modifikovány a bylo provedeno trypsinové štěpení stejným postupem jako v předchozí metodě. Získané peptidy byly nanесeny na záchytovou předkolonu (z angl. "trap column") (Acclaim PepMap300, C18, 5 µm, 300 Å, 300 µm x 5 mm) a následně separovány na koloně EASY-Spray column (50 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm, 100 Å) a použity pro LC/MS analýzu. Použita byla dvojice pufrů: pufr A (2 % AcN, 0,1 % FA) pufr B (80 % AcN, 0,1 % FA). Protokol kapalinové chromatografie sestával ze 4 min 15 µl/min nanášení vzorku, lineárního gradientu 2 – 40 % B po dobu 60 minut a 90 % B po dalších 8 minut. Eluované peptidy byly převedeny na plynné ionty pomocí ionizace elektrosprejem a analyzovány na hmotnostním detektoru: Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT- qIT, Thermo). Peptidové prekurzory byly zachycovány dle m/z 400 – 1600 s 120K rozlišením (při 200 m/z). MS*MS spektra byla provedena izolací jednotlivých iontů pomocí kvadrupólu a aplikováním normalizované kolizní energie 30. Všechna data byla analyzována pomocí MaxQuant softwaru (verze 1.5.3.8) (Cox a kol. 2014). Dithiometylace byla nastavena jako fixní modifikace cysteinů. Stanovení negativních výsledků (FDR, false discovery rate) bylo stanoveno na 1 %. Pro analýzu získaných MS*MS spekter byl použit vyhledávací program Andromeda a databáze proteinů *Raoultella ornithinolytica* z GenBank databáze, NCBI (červen 2015, 7631 sekvencí).

Filtrovaná data byla analyzována autorem diplomové práce v programu Perseus (Tyanova a kol. 2016), manuálně anotována a tříděna na základě funkce analogicky publikovaným postupům (Komatsu a kol. 2013).

4.2.9 Stanovení toxicity

Vliv alkaloidů morfinové řady na růst

Inhibiční efekt byl sledován stanovením OD₆₀₀ kultury rostoucí v LB mediu (20 ml, 200 rpm, 28 °C) a při nárůstu na LB mediu obohaceném o daný morfinan v koncentraci 1 g.l⁻¹ (20 ml, 200 rpm, 28 °C). Všechny použité baňky byly inokulovány 2 % inokulem z 24 h staré kultury a 2 h kultivovány bez přídavku alkaloidu morfinové řady. Celkové trvání pokusu bylo 72 hodin. Po této době byl z kultury odebrán vzorek (100 µl) a pomocí ředící řady a výsevu na LB misky bylo stanoveno množství životaschopných buněk tzv. CFU (z angl. "colony

forming units"). Pokus byl prováděn ve třech nezávislých experimentech. Použity byly všechny dostupné substráty tak, jak jsou popsány v sekci 4.1.2.

Stanovení akutní toxicity

Uspořádání tohoto pokusu mělo ukázat schopnost přežití buněk v časně exponenciální fázi při vystavení účinkům alkaloidů morfinové řady po dobu jedné hodiny. Buňky z 24 hodin staré kultury byly inokulovány (2 %) do 20 ml čerstvého LB media a kultivovány po dobu 2 hodin. Po této době byla přidána testovaná látka (viz 4.1.2 alkaloidy morfinové řady) a buňky byly kultivovány 60 minut. Akutní toxicita byla vyhodnocena stanovením poměru počtu CFU u kontrolní skupiny na čistém LB mediu a na mediu s testovaným substrátem. Pokus byl také proveden ve třech nezávislých experimentech.

5 Výsledky

Experimentální výsledky jsou chronologicky řazeny do šesti kapitol. Kapitoly 5.1 a 5.2 se zabývají charakterizací studovaných kmenů a identifikací biotransformačních meziproduktů, které mohou být zodpovědné za toxické účinky odbourávaných látek. Kapitola 5.3 je zaměřena na hledání projevů toxicity na základě komparativní proteomické analýzy. Kapitoly 5.4 a 5.5 experimentálně ověřují možné mechanismy – Michaelovu adici a autooxidaci, kterými alkaloidy morfinové řady působí na bakteriální buňky. Poslední kapitola výsledků 5.6 je věnována roli bakteriálních proteinů z rodiny OYE v metabolismu studovaných kmenů.

5.1 Biotransformační schopnost vybraných mikroorganismů

Pro zjištění biotransformačních a biodegradačních charakteristik zvolených mikroorganismů byla sledována závislost nárůstu mikroorganismu a metabolismu kodeinu použitého v rozdílných koncentracích. Degradace byla sledována s 10 % (ww/v) buněčnou biomasou. Nárůst byl sledován na LB mediu pro kmeny R89-1 a XL-1 a na minerálním BSBTE mediu pro kmen KDF8. Stanovení produktů biotransformace bylo provedeno pomocí HPLC a jako kontrolní vzorek byl použit extrakt z čistého sterilního media. Všechny substráty nesoucí ve své molekule hydroxyl na uhlíku C14 jsou označovány jako autooxidační produkty (14-OH-kodein, 14-OH-kodeinon, 14-OH-dihydrokodeinon). Výsledky jsou shrnuty do tabulky č. 1. Kalibrační křivka pro analytické stanovení kodeinu je ukázána jako příloha, obrázek č. S1.

Tabulka č. 1 – Biotransformační a biodegradační schopnost studovaných kmenů

Organismus (10 % ww/v suspenze)	Koncentra ce Kodeinu [g.l ⁻¹]	Degradace za 24 h [%]	Degradace za 48 h [%]	Autooxida ční produkty % za 24 h	Autooxida ční produkty % za 48 h	Koncentra ce biomasy 24 h [g.l ⁻¹]	Koncentra ce biomasy 48 h [g.l ⁻¹]
<i>Agrobacterium</i> sp.R89-1	0	-	-	-	-	4,3±0,20	5,1±0,21
	0,2	0*	9±3,0	100	100	2,3±0,14	2,4±0,12
	1,0	0*	4±1,2	90±4	100	1,6±0,08	1,5±0,10
<i>Raoultella</i> sp. KDF8	0	-	-	-	-	6,5±0,32	7,4±0,74
	0,2	30±1,9	45±2,8	4±0,2	8±0,4	4,3±0,19	5,1±0,17
	1,0	22±1,1	27±2,0	3±0,1	12±0,5	4,1±0,16	3,8±0,25
<i>Escherichia coli</i> XL-1	0	-	-	-	-	3,6±0,15	3,5±0,13
	0,2	0*	0*	<1 %	<1 %	3,4±0,11	3,2±0,12
	1,0	0*	0*	<1 %	<1 %	2,8±0,09	2,9±0,10

*Úbytek kodeinu byl nižší než analytická chyba stanovení (3 %).

- koncentrace biomasy byla stanovena jako suchá hmotnost

Časový průběh zastoupení hlavních metabolitů biotransformace je ukázán v tabulce č. 2. Z obou tabulek vyplývá velmi markantní rozdíl mezi studovanými kmeny. U kmene *Agrobacterium* sp. R89-1, který není schopný účinně degradovat kodein, dochází k velmi rychlé akumulaci C-14 hydroxylovaných produktů biotransformace, zvláště 14-OH-kodeinu a k celkové utilizaci kodeinu téměř nedochází. Ze všech kmenů je kmen R89-1 nejcitlivější vůči kodeinu.

Mikroorganismus *Raoultella* sp. KDF8 nevykazuje tak vysokou akumulaci hydroxylovaných produktů. Kodein je preferenčně degradován a na koncentraci biomasy v prvním stanovení (24 h) nemá velký dopad. Buňky kmene XL-1 nevykazují žádnou biotransformační aktivitu a koncentrační efekt kodeinu na růst kultury je malý.

Tabulka č. 2 – Biotransformační produkty

Organismus (10 % ww/v suspenze)	Majoritní produkty	Doba kultivace: 6 h	12 h	18 h	24 h	48 h	72 h
<i>Agrobacterium</i> sp.R89-1	14-OH-kodeinon	1±0,2	8±1,3	11±1,5	18±2,1	20±2,0	14±1,1
	14-OH-kodein	6±0,6	34±2,0	57±3,4	74±5,4	79±3,1	85±3,5
<i>Raoultella</i> sp. KDF8	14-OH-kodeinon	1±0,1	1±0,1	2±0,1	3±0,1	11±0,5	16±1,3
	14-OH-kodein	0	0	0	0	1±0,1	1±0,1

- výchozí množství kodeinu 1 g.l⁻¹

- všechny hodnoty jsou uvedeny v % z celkově identifikovaného množství v dané analýze (výchozí látka + produkty). Tento přístup zohledňuje degradaci u kmene KDF8.

5.2 Toxicita morfinových látek vůči kmeni R89-1

Toxicita morfinových substrátů vůči buňkám byla stanovována po 1 h působení (akutní toxicita) a jako dlouhodobý vliv na růst kultury mikroorganismu. Stanovován byl vliv pouze na kmen *Agrobacterium* sp. R89-1, který je na toxické účinky morfinanů nejcitlivější (viz tabulka č. 1). Výsledky toxicitní studie jsou zpracovány do tabulky č. 3 ukazující v případě vlivu na růst pouze finální stav kultury po 50 h. Celé růstové křivky pro kultury kmene *Agrobacterium* sp. R89-1 jsou ukázány jako součást příloh, obrázek č. S2.

Tabulka č. 3 – toxicita morfinových látek pro *Agrobacterium* sp. R89-1

Morfinan (deriváty kodeinu)	Akutní toxicita – živé b. [%]	Inhibice růstu – OD po 50 h [%]	Morfinan (deriváty morfinu + thebain)	Akutní toxicita – živé b. [%]	Inhibice růstu – OD po 50 h [%]
Kontrolní vzorek	100	100		100	100
14-OH-dihydrokodein	46,1	76.4	Dihydromorfin	48,2	62.8
dihydrokodein	54,6	70.9	14-OH-dihydromorfinon	43,1	60.5
14-OH-dihydrokodeinon	44,7	65.9	Dihydromorfinon	43,2	62.0
dihydrokodeinon	49,1	61.6	14-OH-morfin	54,2	56.6
14-OH-kodein	55,3	54.0	Morfin	50,2	52.5
kodein	65,6	46.4	14-OH-morfinon	47,1	2.5
14-OH-kodeinon	41,1	16.3	Morfinon	35,6	1.7
kodeinon	34,4	4.8	Thebain	48,3	45.9

- Všechny studované látky byly přidány na výslednou koncentraci 1 g.l⁻¹. Mikroorganismus *Agrobacterium* sp R89-1 v časně exponenciální fázi (2 h růstu) byl vystaven působení studovaných látek po dobu 1 h (akutní uspořádání) či po celou dobu růstu (inhibiční uspořádání).

Mezi testovanými substráty jsou patrné dvě skupiny. První skupina zastávající majoritu testovaných substrátů není v tabulce zvýrazněna a inhibice růstu se pohybuje kolem hodnoty 50 %. Druhá skupina je zvýrazněna šedě a nachází se v ní látky kodeinon, 14-OH-kodeinon, Morfinon a 14-OH-morfinon. Tato skupina nevykazuje akutní toxicitu výrazně vyšší než ostatní substráty, ale její vliv na růst je velmi významný. V případě morfinonu a 14-OH-morfinonu odpovídá OD₆₀₀ po 50 hodinách růstu hodnotě kolem 2 %, což je hodnota odpovídající inokulovanému množství. Kontrolní výsev potvrdil, že buňky jsou v tomto případě mrtvé. Stejný výsledek vykazuje i kodeinon. Látka 14-OH-kodeinon vykazuje přežití 8 % buněk v porovnání s kontrolou na konci experimentu (50 h).

Všechny látky vykazující vysokou inhibici růstu jsou svojí chemickou povahou α,β -nenasycené ketony, které snadno podléhají Michaelově adici. Přítomnost 14-OH skupiny toxicitu snižuje a to zvláště u kodeinonu. Vliv adiční reakce na životaschopnost buněk byl testován pomocí hmotnostní spektrometrie a stanovení volných thiolů a výsledky jsou popsány v kapitole 5.4.

5.3 Proteomická studie rostoucí kultury *Raoultella* sp. KDF8

Komparativní proteomická analýza měla za cíl detekci nadprodukovaných a naopak reprimovaných proteinů, které by mohly poukázat na fyziologický stav buňky a tedy i odhalit fyziologickou odpověď na morfinové alkaloidy vznikající v mediu s kodeinem. Technicky byla experimentální práce vykonávána ve spolupráci s Laboratoří hmotnostní spektrometrie PŘFUK.

Mikroorganismus *Raoultella* sp. KDF8 byl kultivován na minerálním BSBTE mediu s přídavkem 1 g.l⁻¹ glycerol (kontrolní vzorek), 1 g.l⁻¹ kodein a 1 g.l⁻¹ kodein + 1 g.l⁻¹ glycerol. Buňky byly odebrány po 24 h kultivace, rozbity pomocí sonikace a bezbuněčný extrakt byl podroben analýze.

Výsledná data obsahovala 2748 identifikovaných proteinů. Po odstranění nekvalitně přiřazených peptidů a nedostatečně průkazných dat bylo identifikováno 1979 proteinů pro porovnání růstu na glycerolu a růstu s kodeinem a 2034 proteinů pro srovnání růstu na glycerolu a na směsi glycerolu s kodeinem. Soubor porovnávaných dat byl dále omezen o všechny proteiny podílející se na bazálním metabolismu. Výsledný soubor byl manuálně revidován a byly hledány možné projevy toxických účinků kodeinu. Nejvýznamnější identifikované proteiny, které byly prokazatelně nadprodukovány jsou ukázány v tabulce č. 4 společně s popisem jejich funkcí.

Tabulka č. 4 – Komparativní proteomická analýza

Protein ID	Název proteinu v anglickém jazyce	MS/MS spektra	Změna	Funkce
gi 480477527	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	38	3,2	biogeneze Fe-S kofaktorů
gi 491006777	fe/S biogenesis protein nfuA	257	2,8	biogeneze Fe-S kofaktorů
gi 480475224	ferritin	145	7,3	homeostáza železa
gi 505398525	bacterioferritin	294	4,4	homeostáza železa
gi 480476167	azoreductase	55	ON	katabolismus azobenzenu
gi 505396722	malate:quinone oxidoreductase	77	ON	katabolismus fenolických látek
gi 480476056	4-oxalocrotonate tautomerase	57	ON	katabolismus toluenu
gi 505398726	aryl alcohol dehydrogenase (Aldo-keto reductase)	213	4,5	katabolismus toluenu a xylenu
gi 491004416	multidrug efflux RND transporter permease subunit	45	ON	membránový transport
gi 505398596	MFS transporter	51	ON	membránový transport
gi 480477230	ABC transporter ATP-binding protein YbbA	74	ON	membránový transport
gi 490997017	nitrogen regulatory protein P-II 2	199	ON	metabolismus dusíku
gi 480477293	ammonium transporter	42	ON	metabolismus dusíku
gi 480478796	nitrite reductase subunit NirD	36	ON	metabolismus dusíku
gi 505397335	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha	59	ON	metabolismus katechinu
gi 480476129	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta	28	ON	metabolismus katechinu
gi 505396648	quercetin 2,3-dioxygenase	23	ON	metabolismus quercetinu
gi 480475674	N-ethylmaleimide reductase	177	ON	OYE (morphinon reduktáza)
gi 695803033	ferrichrome-iron receptor	138	Off	příjem a homeostáza železa
gi 505397741	catecholate siderophore receptor Fiu	99	Off	příjem a homeostáza železa
gi 480478940	toluene ABC transporter permease	51	ON	příjem aromatických sloučenin
gi 480479439	manganese/iron transporter ATP-binding protein	181	Off	příjem Mn a Fe
gi 505397560	iron transporter	40	Off	příjem železa
gi 505396801	Putative capsule protein	25	ON	protein biogeneze pouzdra
gi 480477354	peroxidase	507	18,0	protein reakce na oxidační stress
gi 505398441	biotin sulfoxide reductase	68	ON	protein reakce na oxidační stress
gi 480477030	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	346	13,5	protein reakce na oxidační stress
gi 505397094	superoxide dismutase	109	7,7	protein reakce na oxidační stress
gi 505397799	Non-heme chloroperoxidase	312	3,4	protein reakce na oxidační stress
gi 480474806	dyp-type peroxidase	253	4,2	protein reakce na oxidační stress
gi 505397257	catalase/hydroperoxidase HPI(I)	861	1,9	protein reakce na oxidační stress

Jak je z tabulky patrné, identifikované proteiny se účastní procesů na homeostazi železa, oxidačním stresu, metabolismu dusíku, utilizaci aromatických látek (degradace kodeinu) a na stavbě membrány a pouzdra (kapsuly). K vysoké nadprodukci dochází i pro enzym N-ethylmaleimid reduktázu, který patří do rodiny OYE proteinů a je zodpovědný za morfinon reduktázovou aktivitu. Toto tvrzení bylo ověřeno v naší laboratoři pomocí heterologní exprese enzymu a stanovení jeho aktivity s kodeinonem. Výsledky jsou uvedeny jako příloha č. P1. Tento enzym není v kontrolním vzorku vůbec exprimován. Enzymy podezřelé z morfin-6-dehydrogenázové aktivity (aldo-keto reduktázová rodina a rodina dehydrogenáz s krátkým řetězcem) nejsou nadprodukované s výjimkou aryl-alkohol dehydrogenázy (nadprodukována 4.5). Hledání sekvenčních homologů morfin-6-dehydrogenázy v dostupných genomech rodu *Raoultella* nevedlo k identifikaci žádného kandidátního proteinu, kvůli příliš nízké shodě sekvencí. Zajímavá je absence nadprodukce genů pro syntézu a funkci glutathionu v buňce, což indikuje nízký vliv Michaelovy adice kodeinonu.

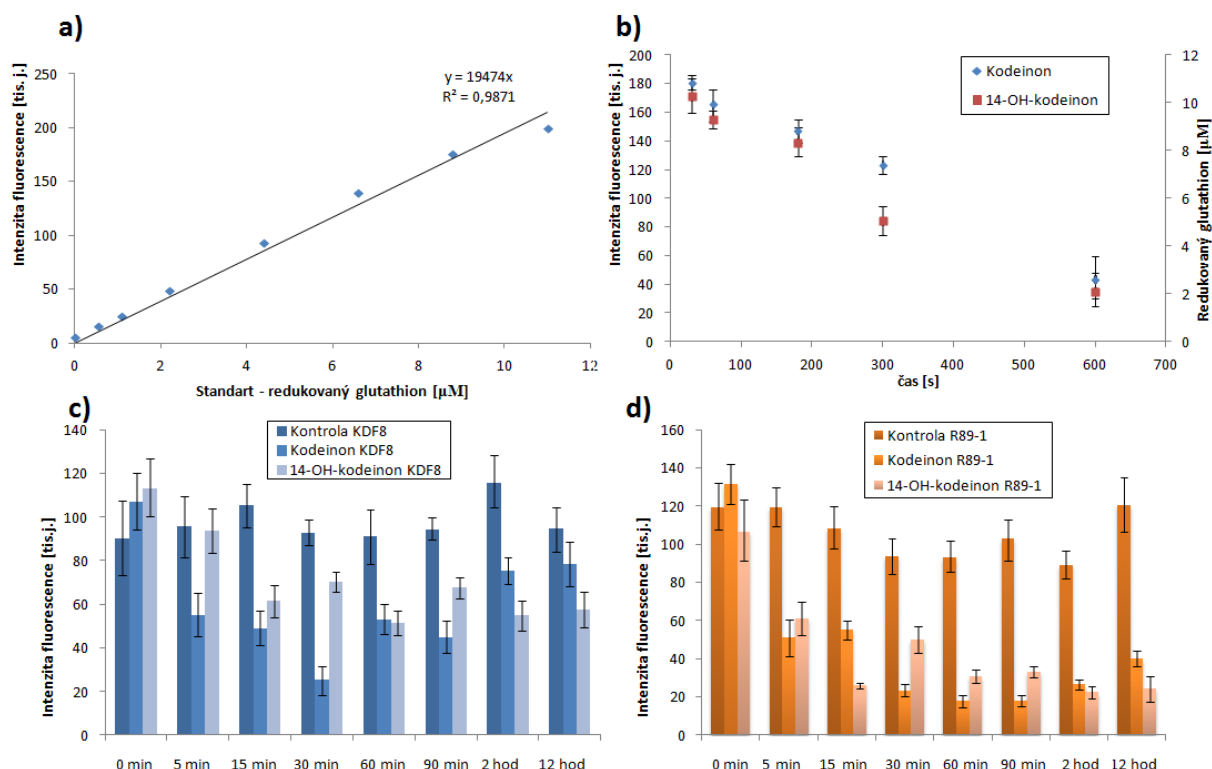
Proteomická studie mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1 byla provedena pro buňky ve stacionární fázi v PBS pufru s přítomností glycerolu či kodeinu (6 hodin kultivace, 1 g.l⁻¹). Tohoto uspořádání bylo nutno použít pro vyloučení vlivu komplexního LB media. Získáno bylo pouze 754 validních proteinových identifikací vhodných ke komparaci. Celou studii bude tedy nutno opakovat tak, aby byla srovnatelná s předchozí studií na organismu *Raoultella* sp. KDF8 a bylo možno vyvozovat společné závěry. I přes toto omezení je v dostupných datech evidentní přítomnost oxidačního stresu a nízká nadprodukce proteinů zajišťujících homeostazi železa (1,5 - 3×). Dále chybějí v analyzovaném souboru dat proteiny podílející se na degradaci aromatických látek. Jediný podezřelý z této aktivity je enzym dioxygenáza: "Ring hydroxylating dioxygenase" (id: FOL789_AGRSH). Tento výsledek potvrzuje omezenou schopnost kmenu R89-1 využít kodein jako zdroj uhlíku nebo energie. Přes detailní hledání v primárních datech (mz spektra) nebyla nalezena změna v expresi proteinu XdpB (OYE, morfinon reduktázová aktivita).

5.4 Michaelova adice

Rychlost reakce Michaelovy adice byla testována pro kodeinon a 14-OH-kodeinon. Jako nukleofilní činidlo byl využit redukovaný glutathion. Měřena byla koncentrace volných thiolových skupin (nemodifikovaných Michaelovou adicí) pomocí komerčně dostupné soupravy Measure-iT™ Thiol Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Kalibrační křivka ukazující závislost intenzity fluorescence činidla na koncentraci redukovaného glutathionu je ukázána na obrázku č. 7a. Vlastní měření rychlosti adice je ukázáno na obrázku 7b.

Jak je z tohoto obrázku patrné, výchozí množství glutathionu (koncentrace 10 μM) reaguje s ekvimolárním množstvím studovaného α,β -nenasyceného ketonu rychle. Po deseti minutách více než 70 % glutathionu nemá volnou thiolovou skupinu.

V případě buněk vystavených kodeinonu nebo 14-OH-kodeinonu je rychlost reakce zpočátku podobná. Později je v buňkách udržována nízká konstantní hladina volného glutathionu. Mikroorganismus *Raoultella* sp. KDF8 vykazuje výrazně nižší úbytek a udržení vyšší hladiny redukovaného glutathionu než vykazuje *Agrobacterium* sp. R89-1 (obrázek č. 7c a 7d).



Obrázek č. 7 – Studium Michaelovy adice pomocí stanovení volných thiolových skupin

a) Kalibrační křivka fluorescenčního stanovení volných thiolových skupin pomocí Measure-iT™ Thiol Assay Kit. b) Stanovení rychlosti Michaelovy adice *in vitro* experimentu pomocí úbytku volných thiolových skupin glutathionu. c) Stanovení volných thiolových skupin (Measure-iT™) v buňkách *Raoultella* sp. KDF8 při kultivaci s 1 mM kodeinonem či 14-OH-kodeinonem. d) Stanovení volných thiolových skupin (Measure-iT™) v buňkách *Agrobacterium* sp. R89-1 při kultivaci s 1 mM kodeinonem či 14-OH-kodeinonem.

Reakční produkty Michaelovy adice na volné cysteiny v buňce byly hledány v proteomu kmenu R89-1 s cílem najít a identifikovat nejvíce modifikované proteiny. Zkoumány byly dva odlišné vzorky (redukováný / neredukovaný pomocí TCEP) triptických štěpů získaných z proteomu *Agrobacterium* sp. R89-1. Bohužel v našich datech nebyly nalezeny žádné signifikantní modifikace, kde by došlo k prokazatelné adici na uhlík 8. Srovnáním dat z redukováného a neredukovaného vzorku byly hledány další neidentifikované modifikace. Hmotnost peptidu obsahující cystein v redukováném vzorku (modifikovaný činidlem MMTS) poskytla vzor pro hledání stejného či modifikovaného peptidu v neredukovaném vzorku. Bohužel, v obou dvou případech byla nalezena majoritní část štěpů stejných a je tedy možné říci, že většina cysteinů nebyla modifikována. Adice kodeinonu se projevila v intaktní hmotnosti až za experimentálního uspořádání zahrnujícího působení 1 mM kodeinonu

na hovězí sérový albumin o koncentraci 1 mg.ml⁻¹. Z tohoto experimentu lze usuzovat na majoritní roli glutathionu v případě Michaelovy adice kodeinonu a 14-OH-kodeinonu.

5.5 Studium oxidačního stresu

Potvrzení vzniku oxidačního stresu a měření jeho kinetiky bylo provedeno pomocí dichlorofluorescein diacetátové sondy na fluorescenční čtečce CLARIOstar. Tato čtečka umožňuje dlouhodobou kultivaci mikroorganismů při termostatované teplotě 28°C za stálého míchání kultury (50 rpm). Pouze během měření (cca 10 s) je destička v klidu. Výsledky fluorescenčního měření jsou přehledně shrnuty do tabulky č. 5. Po konci měření byla stanovena životaschopnost (počet CFU) a čistota bakteriální kultury kontrolním výsevem. Z odebraného vzorku byla provedena kvantitativní analýza přítomnosti 14-OH produktů biotransformace. Výsledky této analýzy jsou ukázány v tabulce č. 6.

Tabulka č. 5 – Studium oxidačního stresu pomocí Dcf-da sondy

Organismus (10 % ww/v biomasa)	Substrát	Fluorescence Dcf-da sondy (norm.)								
		0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h
<i>Agrobacterium</i> sp. R89-1	Kontrola	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Kodein	1,44	10	7,8	5,58	4,23	5,3	6,6	7	6,3
	Kodeinon	4,93	11	13	15,6	16,9	16	19	19	18
	14-OH-kodeinon	2,93	4	2,4	1,94	1,85	2	2	2	2,2
	Kodeinon + GTH	3,4	6,8	6	5,86	6,25	6,6	6,7	6	6,3
	Kodeinon + DIPY	1,6	2,5	3	3,52	3,76	4,3	4,7	5	4,9
	Kodeinon + ThioU	2,7	5,3	15	21,3	20,6	18	16	15	17
<i>Raoultella</i> sp. KDF8	Kodein	1,03	1,1	1,7	2,33	2,45	3	3,5	4	3,9
	Kodeinon	1,3	1,8	2,1	2	1,88	2,5	2,8	3	2,9
	Kodeinon+DIPY	0,92	1	1,6	1,62	1,48	2	2,2	2	2,3
<i>Escherichia coli</i> XL-1	Kodein	0,81	2,1	4,8	5,76	5,64	4,2	3,3	3	3,1
	Kodeinon	1,31	4,9	4,5	3,91	3,68	3,3	2,6	2	2,4
	Kodeinon +DIPY	1,11	3,7	3,3	2,9	2,71	2,4	1,9	2	2,1

- Hodnoty jsou normalizovány na kontrolní vzorek, pro každý mikroorganismus zvlášť.

- Ovlivnění produkce ROS pomocí thiomochoviny (ThioU), glutathionem (GTH) či dipyridylem (DIPY).

Tabulka č. 6 – Studium 14-OH hydroxylační reakce

Organismus	Substrát	14-OH hydroxylace*											
		0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	24h	48h	72h
<i>Agrobacterium</i> sp. R89-1	Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kodein	0	1	3	7	15	25	42	51	59	90	100	100
	Kodeinon	0	4	7	21	27	36	48	61	72	100	100	100
	14-OH-kodeinon	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Kodeinon + GTH	0	0	1	8	16	26	39	48	56	78	100	100
	Kodeinon + DIPY	0	0	1	4	12	16	22	29	34	42	55	73
	Kodeinon + ThioU	0	2	8	23	33	41	50	59	68	100	100	100
<i>Raoultella</i> sp. KDF8	Kodein	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	12	17
	Kodeinon	0	0	1	1	3	6	12	21	29	37	52	64
	Kodeinon+DIPY	0	0	0	0	1	3	7	12	15	17	21	26
<i>Escherichia coli</i> XL-1	Kodein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kodeinon	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	Kodeinon +DIPY	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1

* Množství 14-OH substrátů je vyhodnoceno z výchozího množství kodeinu a je uvedeno v %.

Produkce ROS v mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1

Z výsledků ukázaných v tabulce č. 5 je patrná vysoká produkce ROS v případě buněk s kodeinonem. Přídavek thiomočoviny nemá na produkci ROS žádný vliv. Oproti tomu přídavek glutathionu do media zpomaluje a potlačuje produkci ROS, i když k ní stále dochází. Vzorek obsahující kodein jako výchozí substrát vykazuje rychlý nárůst ROS a následně se jeho hladina drží cca na 20 % hodnoty u kodeinonu. Substrát 14-OH-kodeinon vykazuje slabý nárůst hodnot ROS oproti kontrole. Ve všech vzorcích kromě 14-OH-kodeinonu byl nalezen rostoucí obsah 14-OH produktů (viz tabulka č. 6) a dochází tedy k biotransformaci daného substrátu. Kontrolní výsevy zjistily rychlý pokles viability buněk u experimentu s kodeinonem a kodeinonem s thiomočovinou až na hodnoty 10-20% po 16 h.

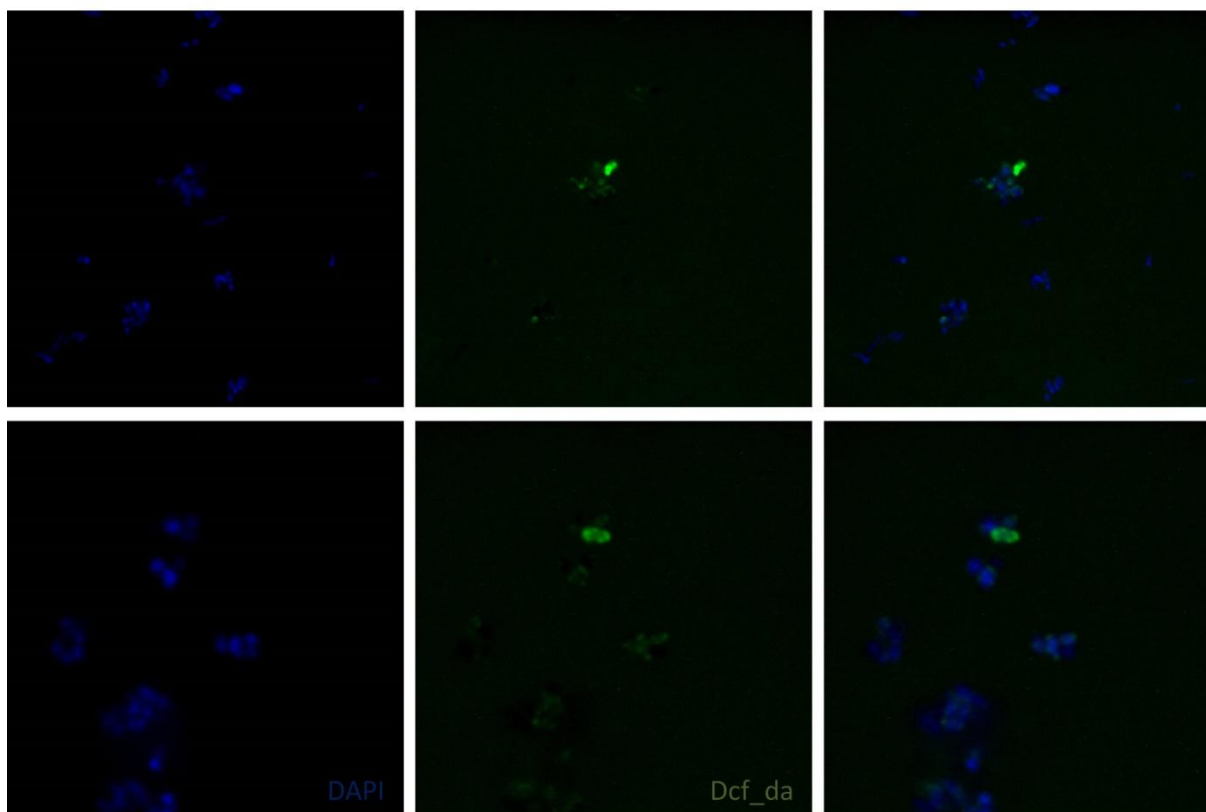
Produkce ROS v mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8

Oproti mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1, *Raoultella* sp. KDF8 vykazuje nízký nárůst oxidačního stresu. K nárůstu produkce ROS dochází až po 6-10 hodinách. V této době začne také docházet k nárůstu 14-OH produktů v biotransformačním mediu. Kodein a kodeinon nevykazují žádný dramatický rozdíl ve fluorescenčním signálu. Produkce a akumulace hydroxylovaných substrátů je také pomalejší než u buněk *Agrobacterium* sp. R89-1. Viabilita buněk na konci experimentu je stále vyšší než 50 %.

Produkce ROS v mikroorganismu *Escherichia coli* XL-1

Tento mikroorganismus byl zvolen jako kontrolní kmen nevykazující žádné biotransformační schopnosti na kodeinu. Sledované podmínky vykazují nárůst produkce ROS z počátku experimentu a tedy vznik oxidačního stresu u studovaného kmene. U všech sledovaných podmínek dochází zhruba ke stejnému zvýšení fluorescenčního signálu. Kontrolní HPLC měření ukazuje pouze zbytková množství 14-OH produktů v případě substrátu kodeinonu. U buněk v přítomnosti kodeinonu nemůže dojít k nárůstu produkce ROS pouze v případě, že se kodeinon nedostane do cytoplazmy buněk nebo je účinně transportován ven. Pozorovaná reakce tak ukazuje na možnou přítomnost přenašečových systémů. Nadprodukce některých přenašečových molekul byla ukázána také v kapitole 5.4. Kontrolní výsevy zjistily, že po ukončení experimentu je životaschopných více než 50 % buněk.

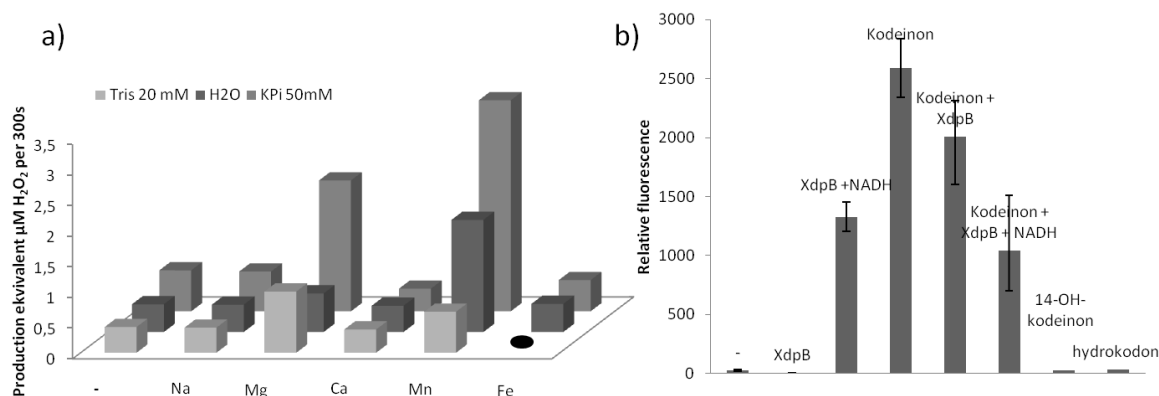
Pro ověření zdali dochází skutečně ke vzniku oxidačního stresu v buňkách a nejedná se o experimentální artefakt, byla použita konfokální mikroskopie s Dcf-da sondou. K obarvení všech buněk byla použita fluorescenční sonda DAPI, která barví AT bohaté sekvence DNA. Buňky byly preinkubovány s kodeinem (1 g.l^{-1}) a Dcf-da 5 hodin. Z tabulky č. 4 je patrné, že po této době je hodnota fluorescenčního signálu téměř na svém maximu. Získané fluorescenční snímky jsou ukázány na obrázku č. 8. Na snímcích je zřetelně vidět fluorescenční signál dichlorofluoresceinu kolokalizující se signálem DAPI, což indikuje správnost našeho měření.



Obrázek č. 8 – Konfokální mikroskopie Levý sloupec ukazuje fluorescenční signál DAPI (bakteriální chromozom), střední fluorescenční signál odpovídající fluorescenci sondy Dcf_da (produkce ROS). V pravém sloupci je překryv obou signálů. Snímky jsou pořízeny pro dvě nezávislá stanovení.

Sledování vzniku oxidačního stresu po přidání 14-OH-kodeinonu, který vykazuje stejnou intenzitu Michaelovy adice jako kodeinon, ale oxidační stres nevyvolává, bylo impulzem pro hledání jiného mechanismu. Výrazný nárůst reaktivních forem kyslíku a 14-OH produktů, jak byl ukázán v tabulkách č. 5 a 6 vedl k formulování hypotézy, že je tato reakce v přímé souvislosti s oxidačním stresem. Z tohoto důvodu byla testována schopnost kodeinonu generovat peroxid vodíku vedlejší reakcí při kovy katalyzované autooxidaci (z angl. "incidental metal ion catalysed autooxidation"). Experimentálně bylo stanovení provedeno pomocí fluorescenční sondy Amplex® Red. Výsledky jsou ukázány na obrázku č. 9a. Z výsledků je zřejmé, že v celé škále podmínek dochází k produkci peroxidu vodíku v případě katalýzy Mn^{2+} a Mg^{2+} . HPLC stanovení přítomnosti 14-OH-kodeinonu průběh autooxidační reakce potvrzuje s výtěžkem cca 35-50 % po uplynutí 1 h. V ostatních podmínkách bylo zjištěno pouze stopové množství 14-OH-kodeinonu. Železnaté ionty produkci peroxidu vodíku nepodporují a tris-pufr nesoucí primární aminoskupinu vykazuje potlačení autooxidační reakce.

Na obrázku č. 9b je ukázán *in vitro* experiment dokládající vliv OYE enzymů na produkci peroxidu vodíku autooxidací. Reakce katalyzovaná XdpB či Nema (morfinon reduktázová reakce – viz kapitola 5.6) může přispět k potlačení vzniku peroxidu vodíku nasycením dvojně vazby 7-8. Vzniklý produkt hydrokodon nepodléhá autooxidaci, a tudíž ke generování peroxidu vodíku nedochází. Stejně tak je neaktivní i finální produkt autooxidace 14-OH-kodeinon. Enzym XdpB byl purifikován z buněk *E. coli* ArcticExpress ve dvou krocích do čistoty vyšší než 95 % a přidán do reakce s výslednou koncentrací 0,1 mg.ml⁻¹. Detaily přípravy XdpB společně s jeho charakterizací jsou uvedeny jako příloha P2. Negativní kontroly experimentu (Kodeinon + XdpB; XdpB + NADH) ukazují, že samotná XdpB katalyzovaná reakce není významným zdrojem peroxidu vodíku pomocí jedoelektronové redukce. Signál pramenící z přítomnosti NADH je v souladu s daty dostupnými v literatuře a není způsoben produkcí peroxidu vodíku.



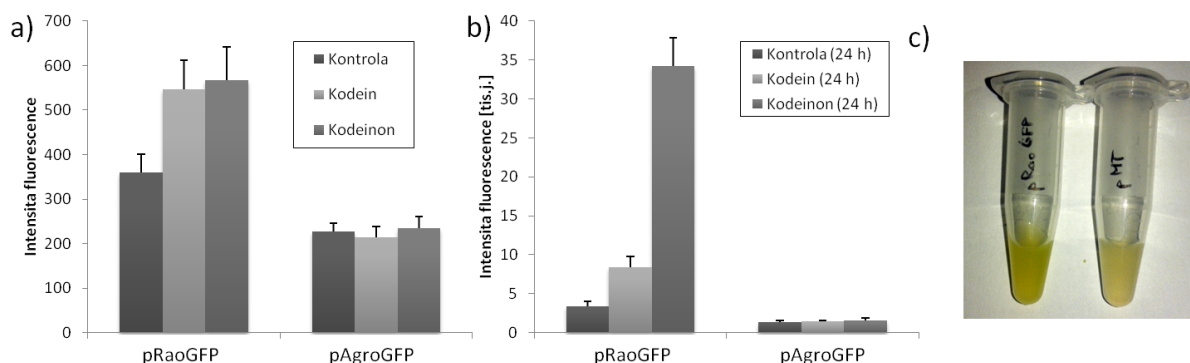
Obrázek č. 9 – Stanovení tvorby peroxidu vodíku pomocí Amplex® Red a) Produkce peroxidu vodíku v závislosti na přítomném kationtu kovu. (-) indikuje reakci bez přítomnosti kovu. Železo v přítomnosti 20 mM Tris pH 8,0 vytváří sraženinu a není tedy možné reakci stanovit (černý kruh). b) Účinek reakce katalyzované enzymem XdpB na produkci peroxidu vodíku autooxidací kodeinonu v přítomnosti 10 μM Mn²⁺.

5.6 Studium exprese OYE

V předchozí kapitole bylo ukázáno, že u mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1 dochází při přítomnosti kodeinu (kodeinonu) v mediu k masivní produkci reaktivních forem kyslíku na rozdíl od zbylých dvou kmenů. Biotransformační experimenty a studie produkce ROS pomocí Dcf_{da} ukázaly přímou souvislost s 14-hydroxylační reakcí, což bylo dále potvrzeno experimenty *in vitro*.

Za účelem zjištění proč se neprojevuje vysoká toxicita kodeinonu a 14-hydroxylační reakce u mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 byla studována exprese Nema a XdpB proteinů nesoucí morfinon reduktázovou aktivitu. Jak bylo již dříve zjištěno v kapitole 5.5, finální produkt enzymové reakce již není zdrojem ROS. Z předchozích experimentů je zřejmé, že v organismu *Raoultella* sp. KDF8 k 14-hydroxylační reakci, která je zodpovědná za produkci peroxidu vodíku, dochází (tabulka č. 5). Nicméně nedochází k vysoké akumulaci 14-OH-kodeinonu. Důvodem pozorovaného rozdílu může být morfinon reduktázová aktivita umožňující další metabolismus těchto látek.

Za účelem ověření této hypotézy a studia syntézy OYE proteinu *in vivo* byly připraveny dva rekombinantní plazmidy. Oba nesou celou transkripční jednotku zodpovědnou za expresi OYE enzymu s integrovaným reportérovým genem GFP (zelený fluorescenční protein). Bioinformatická analýza ukázala (příloha P2), že obě studované transkripční jednotky (OYE + transkripční regulátor) jsou regulovány negativně. Vazba regulátoru ovlivňuje expresi vlastní i expresi studovaného OYE. Zvýšením počtu těchto transkripčních jednotek v buňce by nemělo vést ke změně regulace. Záměna OYE za reportérový gen byla provedena tak, aby okolní sekvence nebyly pozměněny. Sledováním fluorescence takto regulované exprese proteinu GFP je možné *in vitro* sledovat aktivitu studované transkripční jednotky. Výsledky porovnání intenzity fluorescence (po 6 h) jsou ukázány na obrázku č. 10.

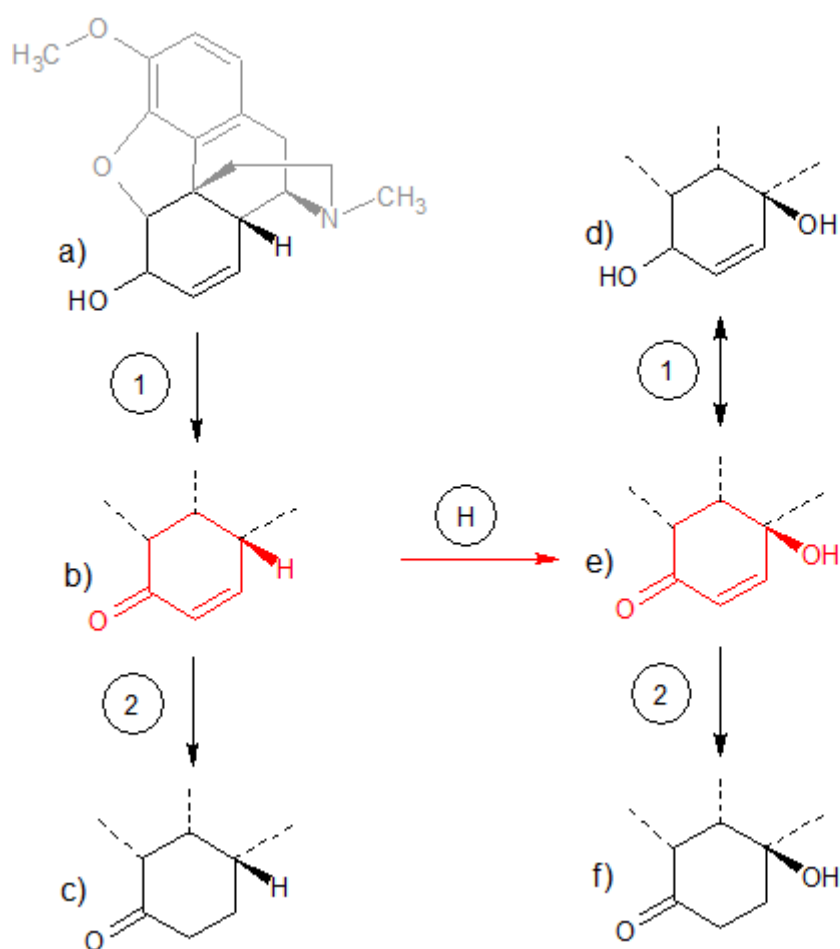


Obrázek č. 10 – Stanovení exprese genů *xdpB* a *nemaA* pomocí reportérových plazmidů pRaoGFP a pAgroGFP a) Porovnání exprese genu *nemaA* (pRaoGFP) a genu *xdpB* (pAgroGFP) pomocí stanovení fluorescence GFP pod transkripční kontrolou těchto genů. Stanovení po 6 h od vystavení buněk kodeinem (kodeinonem). b) Po 24 h. c) Fotografie zachycující vizuální rozdíl (nadprodukci GFP) mezi buňkami *Raoultella* sp. KDF8 nesoucí plazmid pMT (kontrola) a buňkami nesoucími plazmid pRaoGFP po kultivaci s kodeinem (24 h).

Stanovení prokazuje zvýšenou expresi OYE genu u kmene *Raoultella* sp. KDF8 po 6 h od přidání substrátu. U mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1 po této době k žádné změně nedošlo. Po 24 h hodinách je rozdíl v expresi OYE proteinů ještě markantnější. Fluorescenční signál buněk *Raoultella* sp. KDF8 nesoucích plazmid pRaoGFP, indukovaného kodeinonem, je téměř 10×větší než u kontrolního vzorku. Intenzivní exprese GFP je dokonce patrná pouhým okem – viz obrázek č. 10c.

6 Diskuse

Cílem této práce bylo studium vlivu alkaloidů morfinové řady na fyziologii a metabolismus bakteriální buňky a objasnění mechanismů jejich působení. Za tímto účelem byly zvoleny tři modelové organizmy s odlišným metabolismem kodeinu, které byly studovány z hlediska jejich biodegradačního potenciálu pro kodein i z hlediska citlivosti vůči toxickým účinkům produktů jeho metabolismu. Nejprve byla práce zaměřena na vyhodnocení biotransformačních schopností použitých kmenů. Schéma začátku biodegradační dráhy, tak jak bylo identifikováno, pro studované mikroorganizmy je ukázáno na obrázku č. 11.



Obrázek č. 11 – Schéma biotransformace kodeinu v *Agrobacterium* sp. R89-1 a *Raoultella* sp. KDF8 a) kodein, b) kodeinon, c) hydrokodon, d) 14-OH-kodein, e) 14-OH-kodeinon, f) oxykodon; 1 označuje reakce katalyzované morfin-6-dehydrogenázou, 2 – označuje reakce katalyzované morfinon reduktázou (OYE), H – označuje autooxidační reakci; Červeně jsou zvýrazněny toxické meziprodukty metabolismu identifikované v kapitole 5.2.

Mikroorganismus *Agrobacterium* sp. R89-1 byl izolován z průmyslových odpadů máku setého. Vysoce efektivní schopnost biotransformovat kodein na 14-OH deriváty byla publikována v naší laboratoři již dříve (Kyslíková a kol. 2013), stejně jako jeho celogenomová sekvence (Zahradník a kol. 2016). Kvantitativním a kvalitativním stanovením biotransformačních produktů pomocí HPLC (tabulka č. 1 a 2) bylo stanoveno, že ačkoliv kmen R89-1 velmi efektivně biotransformuje kodein na jeho 14-OH deriváty (**d** a **e** v obrázku č. 11), k celkové mineralizaci kodeinu prakticky nedochází. Zároveň je kmen R89-1 ze všech tří kmenů nejvíce citlivý na alkaloidy morfinové řady a OD_{600} i suchá hmotnost kultury vystavené kodeinu rychle klesá.

Mikroorganismus *Raoultella* sp. KDF8 byl také izolován z makových odpadů. Později byly získány i další izoláty v půdách zasažených průmyslovými odpady. Jako fylogeneticky nejbližší kmen byl pomocí multilokusové analýzy identifikován kmen *Raoultella ornithinolytica* B6 (Shin a kol. 2013). Celogenomová sekvence DNA dostupná v databázi GenBank byla využita jako referenční pro náš kmen *Raoultella* sp. KDF8. Zástupci rodu *Raoultella* jsou proslulí fascinující schopností biodegradace například exploziv TNT (Claus a kol. 2007), insekticidů jako dimethoát (Liang a kol. 2009), kyseliny trichlorfenoxycetové (Zharikova a kol. 2006), herbicidu atrazinu (Swissa a kol. 2014), steroidních hormonů (Ji a kol. 2007) a mnoha dalších. Detailní popis vlastností tohoto kmene je připravován pro publikaci, a proto je zmíněná přípravná verze rukopisu součástí příloh k diplomové práci (příloha P3). Naše biotransformační experimenty prokázaly, že *Raoultella* sp. KDF8 je schopna kodein mineralizovat a využít jako zdroj uhlíku a energie. K akumulaci 14-OH-derivátů kodeinu dochází pouze v omezené míře a toxické účinky alkaloidů morfinové řady se u tohoto kmene projevují podstatně méně než v předchozím případě.

Mikroorganismus *Escherichia coli* XL-1 (Blue) je komerčně dostupný kmen, dodávaný firmou Stratagene, se známým genotypem (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)). Tento kmen byl zvolen jako referenční kmen, u kterého nebyla prokázána schopnost biotransformovat kodein ani jeho deriváty. Dalším důvodem pro zvolení tohoto kmene byla jeho omezená schopnost opravy DNA, která měla podle očekávání prohloubit oxidační stres. Přesto byla pozorovaná toxicita morfinanů pro tento kmen nejnížší.

Toxicita všech dostupných derivátů kodeinu, respektive morfinu (tabulka č. 3) byla detailně testována na mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1, který vykazoval pro tyto látky nejvyšší sensitivitu (tabulka č. 1). Všechny studované substráty vykazují inhibiční účinek, který vzrůstal s jejich koncentrací a projevoval se spíše inhibicí růstu nežli akutní toxicitou. Výjimečné postavení mezi studovanými substráty hrají deriváty s chemickou povahou α,β -nenasycených ketonů (obrázek č. 11 – látky **b** a **e**). Jedná se o kodeinon, morfinon, 14-OH-kodeinon a 14-OH-morfinon. Toxicita těchto látek je podstatně vyšší než u ostatních sledovaných substrátů a to zvláště pro nehydroxylované morfinany.

Popsaným mechanismem toxicity α,β -nenasycených ketonů je modifikace biomolekul Michaelovou adicí. Pro kodeinon je tato reakce známa a popsána, zvláště s merkaptoethanolem (Ishida a kol. 1989), glutathionem a cysteinem (Garadnay a kol. 2013), včetně reakcí *in vivo* (Ishida a kol. 1998, Kawase a kol. 2002). Vždy dochází k adici na pozici 8, i když jsou možné i komplexní reakce (Kolev a kol. 2009). Pro 14-hydroxylované deriváty je známo méně údajů, jejich chemická struktura ale Michaelovu adici umožňuje také (Wick a kol. 2011). Naše výsledky tuto aktivitu potvrzují (obrázek č. 7b).

Z důvodu snazší dostupnosti a nižší rizikovosti byly všechny experimenty v této práci prováděny s deriváty kodeinu. Jak naše toxicitní testy ukázaly, lze u derivátů morfinu předpokládat intenzivnější toxicitní efekt. Chemická struktura morfinu a kodeinu se liší pouze v pozici 3, kde reakce popsané v této práci neprobíhají. Z tohoto důvodu předpokládáme stejné mechanismy pro deriváty kodeinu i morfinu.

Za účelem identifikace a popsání mechanismu účinku kodeinonu na kultury kmenů *Agrobacterium* sp. R89-1 a *Raoultella* sp. KDF8 byla provedena diferenční proteomická analýza (tabulka č. 4). Obě dvě analýzy ukázaly na nadprodukcí enzymů účastnících se reakce buňky na oxidační stres a enzymů podílejících se na homeostazi železa. Je známo, že uvolnění železa do vnitrobuněčného prostředí souvisí s oxidačním stresem a poškozením Fe-S kofaktorových center (Hidalgo a kol. 1994). Výsledkem vysoké intracelulární koncentrace železa je prohloubení oxidačního stresu pomocí Fentonových reakcí.

Vysoká produkce enzymů spojených s metabolismem aromatických látek v mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 potvrzuje schopnost úplné mineralizace kodeinu a jeho využití jako zdroje uhlíku a energie. Zvláště reprezentativní je přítomnost protokatechuát dioxygenázy a kvercetin dioxygenázy, které oxidují za účasti molekulárního kyslíku aromatické cykly v široké škále organických látek. Zajímavým poznatkem vyplývajícím

z metabolomické studie je nadprodukce proteinů účastnících se vytváření buněčného pouzdra u mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8. Vytváření pouzdra u tohoto mikroorganismu hraje roli ve virulenci (Pan a kol. 2015). Alkaloidy morfinové řady jsou vysoce nepolární látky a jejich schopnost pronikat do membrány je předpokládána. Tento vliv na membránu by mohl být zodpovědný za indukci proteinů biogeneze pouzdra.

Hypotéza, že toxické účinky morfinových alkaloidů jsou zprostředkovány oxidačním stresem a zvláště pak Michaelovou adicí je známa pro lidské (Jairaj a kol. 2003) a myší buňky (Nagamatsu a kol. 1985, 1986). Tato skutečnost je studována pro svůj možný terapeutický účinek proti nádorovým buňkám (Takeuchi a kol. 2005, 2006). Jednoduchým fluorimetrickým stanovením byla testována rychlost Michaelovy adice kodeinonu a 14-OH-kodeinonu s glutathionem *in vitro*. Analýzou koncentrace volných thiolů v buněčných lyzátech byl stanoven dopad Michaelovy adice také *in vivo* (obr. č. 7.). V experimentálním uspořádání dochází k poměrně rychlé reakci kodeinonu (14-OH-kodeinonu) s glutathionem. Během 5 minut je zhruba 50 % α,β -nenasyceného ketonu přeměněno na finální adukt. Úbytek volných thiolů v buňce jednoznačně ukazuje na to, že k Michaelově adici v buňkách dochází. Její rychlost je vysoká, ale zbytkové množství volných thiolů odpovídajících glutathionu je stále přítomné. Hledání aduktů kodeinonu na cysteiny v proteomu *Agrobacterium* sp. R89-1 nebylo úspěšné. Domníváme se tedy, že Michaelova adice má velký dopad na hladinu glutathionu a volného cysteinu v buňce, ale nedochází k masivní modifikaci proteinů.

K ověření mechanismu vzniku oxidačního stresu v závislosti na biotransformačních reakcích byla použita fluorescenční sonda 2',7'-Dichlorofluorescein diacetát. Výsledky těchto stanovení jsou přehledně ukázány v tabulce č. 4 a č. 5. Velmi dobře je patrná vysoká produkce ROS v mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1 a podstatně snížená produkce v bakteriích *Raoultella* sp. KDF8 a *Escherichia coli* XL-1. Tento výsledek je patrný i přesto, že je měření zatíženo dvěma experimentálními chybami. Kontrolní vzorek kmene R89-1 vykazuje nárůst produkce ROS po 10 hodinách od začátku experimentu, díky čemuž ostatní hodnoty klesají. Nejspíše se jedná o reakci buněk na suboptimální kultivační podmínky a tedy o artefakt. Další chybu ve stanovení činí přesycení fluorescenčního detektoru při hodnotách vyšších než 15. Úprava nastavení by bohužel přinesla snížení citlivosti pro nízké hodnoty intenzity fluorescence. Ověření specifického nárůstu fluorescenčního signálu fluoresceinové sondy uvnitř buněk bylo prokázáno pomocí konfokální mikroskopie a možnost arteficiálního měření reakcí probíhajících v mediu tak byla vyloučena. Buňky pozorované pomocí

mikroskopie vykazují vysoké rozdíly v intenzitě fluorescenčního signálu Dcfh-da. Domníváme se, že tyto rozdíly pramení z různé míry viability pozorovaných buněk a také stochastické odpovědi bakterií na stresové podmínky (Locke a kol. 2011).

Díky provedeným experimentům bylo pozorováno několik významných fenoménů:

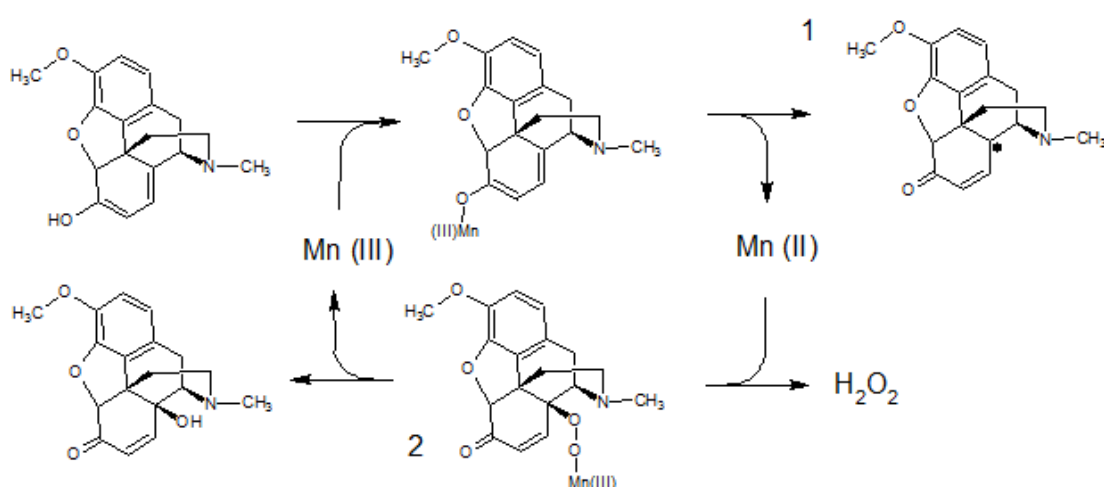
- Hydroxylovaný derivát 14-OH-kodeinon vyvolává výrazně nižší produkci ROS než je tomu u kodeinonu (tabulka č. 5), avšak rychlost Michaelovy adice je pro oba substráty téměř stejná (obrázek č. 7).
- Vysoký přídavek bipyridylu ani glutathionu přímo do media nezabrání vzniku oxidačního stresu u *Agrobacteria* sp. R89-1, pouze jej omezí (30 – 50 %). V případě glutathionu tento výsledek indikuje další možný metabolismus aduktu (opětovná redukce).
- U mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 téměř nedochází k oxidačnímu stresu a to v případě biotransformace kodeinu i kodeinonu. Stanovení volných thiolů v buněčných lyzátech ukazuje na schopnost udržet si vyšší hladinu redukováných forem glutathionu a volného cysteinu.
- Přítomnost oxidačního stresu koreluje s produkcí 14-OH derivátů. U mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 nedochází k akumulaci 14-OH-kodeinonu (14-OH-kodeinu) na rozdíl od kmene R89-1.

Pokud by byla pouze Michaelova adice zodpovědná za toxický efekt kodeinonu na mikrobiální buňky, měla by být produkce ROS s 14-OH-kodeinonem jako výchozím substrátem přibližně stejná. Také jsme očekávali výrazně vyšší omezení produkce ROS pomocí přídavku glutathionu a bipyridylu. Tyto experimentální výsledky vedly k hledání dalšího mechanismu vzniku oxidačního stresu, který je zodpovědný za část toxických účinků. Rozdíly mezi studovanými mikroorganismy a korelace přítomnosti ROS a 14-hydroxylovaných produktů (tabulka č. 6) ukazují na možnou souvislost se 14-hydroxylační reakcí.

Průběh této neenzymové reakce již byl studován a byl navržen reakční mechanismus (Zhang a kol. 2005). Reakce je katalyzována Mn^{2+} či Cu^{2+} ionty a podle autorů zmíněné studie může docházet ke vzniku dvou různých reaktivních forem kodeinonu. Jedná

se o kodeinonový radikál (ukázán na obrázku č. 10 ad 1) a peroxid kodeinonu (Obr. č. 10 ad 2). V našich experimentech s Dcf_{da} sondou bylo ukázáno (tabulka č. 5), že thiomočovina nemá vliv na průběh reakce. Tento výsledek ukazuje spíše na vznik peroxidu, který byl dále experimentálně ověřen.

Vznik peroxidu byl testován v *in vitro* uspořádání pomocí Amplex[®] Red a dvojmocných iontů kovů. Experimenty prokázaly vznik peroxidu vodíku v Mn²⁺ a Mg²⁺ katalyzované reakci. Železo reakci nepodporuje, což objasňuje omezenou účinnost bipyridilu. Schéma autooxidační reakce je ukázáno na obrázku č. 12.



Obrázek č. 12 – Zjednodušené schéma průběhu autooxidační reakce Schéma je v upravené podobě převzato z (Zhang a kol. 2005).

K podobné autooxidační reakci katalyzované dvojmocnými ionty kovů dochází například pro glutathion (Albro a kol. 1986). Mikroorganismy, které biotransformují kodein přes 14-OH deriváty jsou tedy podstatně více ohroženy oxidačním stresem než organismy, které kodein vůbec netransformují nebo kompletně využívají. Závislost autooxidační reakce na koncentraci vnitrobuněčného Mn²⁺ ukazuje na již předchozí vznik oxidačního stresu, který vede ke zvýšení koncentrace těchto iontů. Je pravděpodobné, že k tomuto stavu vede Michaelova adice v případě akumulace kodeinonu nebo 14-OH-kodeinonu. Bylo zjištěno, že intracelulární koncentrace Mn²⁺ je zvyšována jako obrana proti radičnímu poškození proteinů (Daly a kol. 2007). V proteomické studii byly identifikovány proteiny účastnící se transportu manganu jako například mangan/železo transportér (gi|480479439|; manganese/iron transporter ATP-binding protein) se sníženou hladinou exprese. Je pravděpodobné, že k snížení exprese

těchto proteinů došlo v reakci na vysokou intracelulární koncentraci. Tato nepřímá evidence pro roli manganu v autooxidaci kodeinonu bohužel nestačí pro plné objasnění jeho role.

Hlavní rozdíl mezi metabolismem probíhajícím v *Agrobacterium* sp. R89-1 a mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 v přítomnosti kodeinu je v akumulaci 14-OH-kodeinonu (viz tabulka č. 2). Klíčovou úlohu v této akumulaci hraje poměr morfin-6-dehydrogenázové aktivity (reakce číslo 1, obrázek č. 11) a aktivity morfinon reduktázové (reakce číslo 2, obrázek č. 11). Zvláště pak druhý jmenovaný enzym přeměňuje toxické α,β -nenasycené ketony na jejich podstatně méně toxické satureované deriváty. Z tohoto důvodu byla studována exprese OYE enzymů během našich biodegradačních experimentů. Proteomická data ukázala na vysokou indukci OYE proteinu Nema (N-ethylmaleimid reduktáza) u kmene KDF8 během růstu na kodeinu. V kontrolním vzorku při růstu na glycerolu nebyl tento protein vůbec detekován. V *Agrobacterium* sp. R89-1 je situace odlišná a k nadprodukci OYE glycerol trinitrát reduktázy XdpB nedochází. *In vitro* experimenty dokazují, že oba dva zmíněné proteiny jsou schopné katalyzovat redukci kodeinonu.

Pro ověření hypotézy, že exprese OYE enzymu hraje klíčovou roli v akumulaci toxických derivátů kodeinonu a 14-OH-kodeinonu byly připraveny plazmidy nesoucí pod stejnou OYE regulací reportérový gen GFP. Tento experiment ukazuje nadprodukci enzymu N-ethylmaleimid reduktázy (přibližně 1,5 krát po 6 h a 10× po 24 h pro kodeinon) zatímco protein XdpB není nadprodukován. Pozorovaná hodnota neodpovídá předpokladům získaným z protetických dat a proto je potřeba ji dále ověřit. Celý tento experiment bude revidován a doplněn o pozitivní kontrolu s vymutovanými vazebnými místy pro transkripční regulátory. Analýza genomu *Agrobacterium* sp. R89-1 a *Raoultella ornithinolytica* B6 (a příbuzných kmenů) ukazuje na přítomnost pouze jednoho OYE genu v těchto genomech. Zapojení alternativních genů je tedy vyloučeno.

Ačkoliv není přítomnost 14-hydroxylovaných derivátů kodeinu ve vyšších organizmech popsána, jejich vznik není zcela vyloučen a vyžaduje tedy další studium. Vznik kodeinonu byl pozorován u organismů s morfin-6-dehydrogenázou (Nagamatsu a kol. 1985). Lze předpokládat, že zvláště citlivé na pozorované reakce budou buňky v plně aerobním prostředí s vysokým intracelulárním obsahem kovů. Takové podmínky mohou nastávat u jednoduchých jednobuněčných a mnohobuněčných organismů a lze tedy předpokládat jejich vysokou citlivost na kodein.

Věřím, že popsané mechanismy se podaří publikovat a pomohou v dalším studiu mikrobiální transformace morfinových alkaloidů a ve vyhodnocení rizik, která tyto látky jako environmentální polutanty představují.

7 Souhrn

V této diplomové práci byla studována toxicita alkaloidů morfinové řady na tři modelové organismy a mechanismy jejich účinku.

- Testováním akutní toxicity a ovlivněním růstu pomocí morfinových substrátů u mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1 byly nalezeny α,β -nenasycené ketony: kodeinon (morfinon) a 14-OH-kodeinon (14-OH-morfinon) jako biotransformační meziprodukty vykazující toxické účinky na bakteriální buňky. Deriváty morfinu vykazují vyšší toxicitu než deriváty kodeinu.
- Růst na kodeinu nebo jeho biotransformace vyvolává u buněk odpověď na oxidační stres, změnu vlastností membrány a změněnou produkci přenašečových molekul. U mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 byly také odhaleny proteiny podílející se na degradaci aromatických látek (toluen) a tedy další degradaci morfinanového skeletu.
- Studium mechanismu vzniku oxidačního stresu byl objeven dosud nepopsaný fenomén. Již známá Michaelova adice kodeinonu či 14-OH-kodeinonu na volné thiolové skupiny v buňce (glutathion) ruší její oxidačně-redukční rovnováhu. Tento fyziologický stav vede ke zvýšení intracelulární koncentrace volných iontů kovů. Zvýšení koncentrace Mn^{2+} a Mg^{2+} je mediátorem autokatalytické 14-hydroxylace kodeinonu. Při této reakci vzniká jako vedlejší produkt peroxid vodíku, který dramaticky stupňuje oxidační stress (odpověď Dcf_da sondy až 10×) a snižuje tak viabilitu buněk.
- O přežití bakteriálních buněk v přítomnosti kodeinu rozhoduje přítomnost morfin-6-dehydrogenázové reakce. Buňky, které tuto reakci nevykazují (*Escherichia coli* XL-1 (Blue)) jsou ke kodeinu rezistentní. V případě, že je tento krok přítomen, rozhoduje akumulace biotransformačních produktů kodeinonu a 14-OH-kodeinonu. Pouze vysokou nadprodukcí enzymu s morfinon reduktázovou aktivitou (N-ethylmaleimid reduktáza) je mikroorganismus *Raoultella* sp. KDF8 schopen akumulaci a toxické účinky těchto látek potlačit. Protože u buněk mikroorganismu *Agrobacterium* sp. R89-1 k nadprodukcí enzymu s morfinon reduktázovou aktivitou (XdpB) nedochází, je pozorována akumulace 14-OH-kodeinonu a vysoká toxicita spojená s intenzivní autooxidací kodeinonu.

8 Seznam literaturey

- Abel, A.M., Carnell, A.J., Davis, J.A. Paylor, M. (2003): The synthesis of buprenorphine intermediates by regioselective microbial N- and O-demethylation reactions using *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 743-748
- Albro, P.W., Corbett, J.T. Schroeder, J.L. (1986): Generation of hydrogen peroxide by incidental metal ion-catalyzed autooxidation of glutathione. *J Inorg Biochem* 27: 191-203
- Amato, E.D. Stewart, J.D. (2015): Applications of protein engineering to members of the old yellow enzyme family. *Biotechnology Advances* 33: 624-631
- Araujo, M.C., Antunes, L.M. Takahashi, C.S. (2001): Protective effect of thiourea, a hydroxyl-radical scavenger, on curcumin-induced chromosomal aberrations in an in vitro mammalian cell system. *Teratog Carcinog Mutagen* 21: 175-180
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. Storz, G. (1999): Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6161-6165
- Barna, T., Messiha, H.L., Petosa, C., Bruce, N.C., Scrutton, N.S. Moody, P.C. (2002): Crystal structure of bacterial morphine reductase and properties of the C191A mutant enzyme. *J Biol Chem* 277: 30976-30983
- Bielski, B.H., Arudi, R.L. Sutherland, M.W. (1983): A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 258: 4759-4761
- Bruce, N.C., Wilmot, C.J., Jordan, K.N., Trebilcock, A.E., Gray Stephens, L.D. Lowe, C.R. (1990): Microbial degradation of the morphine alkaloids: identification of morphine as an intermediate in the metabolism of morphine by *Pseudomonas putida* M10. *Arch Microbiol* 154: 465-470
- Bueno, M.J.M., Gomez, M.J., Herrera, S., Hernando, M.D., Agüera, A. Fernández-Alba, A.R. (2012): Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring. *Environmental Pollution* 164: 267-273
- Buser, H.-R., Poiger, T. Müller, M.D. (1999): Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology* 33: 2529-2535
- Caliman, F.A. Gavrilescu, M. (2009): Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review. *CLEAN – Soil, Air, Water* 37: 277-303
- Cameron, G.W., Jordan, K.N., Holt, P.J., Baker, P.B., Lowe, C.R. Bruce, N.C. (1994): Identification of a heroin esterase in *Rhodococcus* sp. strain H1. *Appl Environ Microbiol* 60: 3881-3883

Claus, H., Bausinger, T., Lehmler, I., Perret, N., Fels, G., Dehner, U., Preuß, J. König, H. (2007): Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation* 18: 27-35

Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N. Mann, M. (2014): Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics* 13: 2513-2526

Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R.D., Lai, B., Ravel, B., Li, S.M., Kemner, K.M. Fredrickson, J.K. (2007): Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol* 5: e92

De la Cruz, N., Esquius, L., Grandjean, D., Magnet, A., Tungler, A., de Alencastro, L.F. Pulgarín, C. (2013): Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H₂O₂ and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. *Water Research* 47: 5836-5845

de Léséleuc, L., Harris, G., KuoLee, R. Chen, W. (2012): In Vitro and In Vivo Biological Activities of Iron Chelators and Gallium Nitrate against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 5397-5400

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. Hartemann, P. (2011): Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214: 442-448

Einsiedl, F., Radke, M. Maloszewski, P. (2010): Occurrence and transport of pharmaceuticals in a karst groundwater system affected by domestic wastewater treatment plants. *Journal of Contaminant Hydrology* 117: 26-36

Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J. McArdell, C.S. (2011): Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research* 45: 75-92

Fent, K., Weston, A.A. Caminada, D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76: 122-159

French, C.E. Bruce, N.C. (1995): Bacterial morphinone reductase is related to Old Yellow Enzyme. *Biochem J* 312 (Pt 3): 671-678

French, C.E., Hailes, A.M., Rathbone, D.A. Bruce, N.C. (1996): Morphinone reductase. Characterization, cloning, and application to biocatalytic hydromorphone production. *Ann N Y Acad Sci* 799: 97-101

Frick, S., Kramell, R. Kutchan, T.M. (2007): Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metabolic Engineering* 9: 169-176

Garadnay, S., Gyulai, Z., Makleit, S. Sipos, A. (2013): First synthesis of important secondary oxidative metabolites of morphine and codeine with the Michael addition. *Central European Journal of Chemistry* 11: 430-437

Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S. Fava, F. (2015): Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology* 32: 147-156

Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E. Tuteja, N. (2013): Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212

Goldstein, S., Meyerstein, D. Czapski, G. (1993): The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med* 15: 435-445

Gonzalez-Flecha, B. Demple, B. (1995): Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 13681-13687

Grant, R.A., Filman, D.J., Finkel, S.E., Kolter, R. Hogle, J.M. (1998): The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol* 5: 294-303

Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A. Barceló, D. (2010): Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International* 36: 15-26

Gueraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W. Uchida, K. (2010): Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 44: 1098-1124

H. Clark, J. (1999): Green chemistry: challenges and opportunities. *Green Chemistry* 1: 1-8

Hailes, A.M. Bruce, N.C. (1993): Biological synthesis of the analgesic hydromorphone, an intermediate in the metabolism of morphine, by *Pseudomonas putida* M10. *Appl Environ Microbiol* 59: 2166-2170

Halliwell, B. Whiteman, M. (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142: 231-255

Hansen, R.E., Roth, D. Winther, J.R. (2009): Quantifying the global cellular thiol–disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 422-427

Hempel, S.L., Buettner, G.R., O'Malley, Y.Q., Wessels, D.A. Flaherty, D.M. (1999): Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 146-159

Hidalgo, E. Demple, B. (1994): An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *Embo j* 13: 138-146

Chaudhary, V., Leisch, H., Moudra, A., Allen, B., De Luca, V., Cox, D.P. Hudlický, T. (2009): Biotransformations of morphine alkaloids by fungi: N-demethylations, oxidations, and reductions. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 74: 1179-1193

Cho, D., Shin, D., Jeon, B.W. Kwak, J.M. (2009): ROS-Mediated ABA Signaling. *Journal of Plant Biology* 52: 102-113

Ishida, T., Kumagai, Y., Ikeda, Y., Ito, K., Yano, M., Toki, S., Mihashi, K., Fujioka, T., Iwase, Y. Hachiyama, S. (1989): (8S)-(glutathion-S-yl)dihydromorphinone, a novel metabolite of morphine from guinea pig bile. *Drug Metab Dispos* 17: 77-81

Ishida, T., Yano, M. Toki, S. (1998): In vivo formation of codeinone-glutathione adduct: isolation and identification of a new metabolite in the bile of codeine-treated guinea pig. *J Anal Toxicol* 22: 567-572

Jairaj, M., Watson, D.G., Grant, M.H. Skellern, G.G. (2003): The toxicity of opiates and their metabolites in HepG2 cells. *Chem Biol Interact* 146: 121-129

Janzowski, C., Glaab, V., Mueller, C., Straesser, U., Kamp, H.G. Eisenbrand, G. (2003): Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mutagenesis* 18: 465-470

Ji, S., Liu, Z., Liu, Z. Ren, H. (2007): Isolation and characterization of a bacterial strain that efficiently degrades sex steroid hormones. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* 1: 325-328

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N. Lester, J.N. (2002): Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research* 36: 5013-5022

Kawase, M., Sakagami, H., Furuya, K., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Motohashi, N., Morimoto, Y., Varga, A. Molnar, J. (2002): Cell death-inducing activity of opiates in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 22: 211-214

Kim, J.-W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M. Arizono, K. (2009): Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of Toxicological Sciences* 34: 227-232

Klockgether-Radke, A.P. (2002): F. W. Sertürner und die Entdeckung des Morphins. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37: 244-249

Kobayashi, K., Yamamoto, T., Chiba, K., Tani, M., Shimada, N., Ishizaki, T. Kuroiwa, Y. (1998): Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos* 26: 818-821

- Kolev, T., Bakalska, R., Seidel, R.W., Mayer-Figge, H., Oppel, I.M., Spiteller, M., Sheldrick, W.S. Koleva, B.B. (2009): Novel codeinone derivatives via Michael addition of barbituric acids. *Tetrahedron: Asymmetry* 20: 327-334
- Komatsu, S., Han, C., Nanjo, Y., Altaf-Un-Nahar, M., Wang, K., He, D. Yang, P. (2013): Label-free quantitative proteomic analysis of abscisic acid effect in early-stage soybean under flooding. *J Proteome Res* 12: 4769-4784
- Kramlinger, V.M., Alvarado Rojas, M., Kanamori, T. Guengerich, F.P. (2015): Cytochrome P450 3A Enzymes Catalyze the O6-Demethylation of Thebaine, a Key Step in Endogenous Mammalian Morphine Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 290: 20200-20210
- Kumagai, Y., Ikeda, Y. Toki, S. (1992): Hydroxyl radical-mediated conversion of morphine to morphinone. *Xenobiotica* 22: 507-513
- Kunz, D.A., Reddy, G.S. Vatvars, A. (1985): Identification of transformation products arising from bacterial oxidation of codeine by *Streptomyces griseus*. *Appl Environ Microbiol* 50: 831-836
- Kyslíková, E., Babiak, P., Štěpánek, V., Zahradník, J., Palyzová, A., Marešová, H., Valešová, R., Hájíček, J. Kyslík, P. (2013): Biotransformation of codeine to 14-OH-codeine derivatives by *Rhizobium radiobacter* R89-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 87: 1-5
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lamb, D.C., Lei, L., Warrilow, A.G., Lepesheva, G.I., Mullins, J.G., Waterman, M.R. Kelly, S.L. (2009): The first virally encoded cytochrome p450. *J Virol* 83: 8266-8269
- Liang, Y., Zeng, F., Qiu, G., Lu, X., Liu, X. Gao, H. (2009): Co-metabolic degradation of dimethoate by *Raoultella* sp. X1. *Biodegradation* 20: 363-373
- Liras, P., Kasparian, S.S. Umbreit, W.W. (1975): Enzymatic transformation of morphine by hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Applied microbiology* 30: 650-656
- Lister, D.L., Kanungo, G., Rathbone, D.A. Bruce, N.C. (1999): Transformations of codeine to important semisynthetic opiate derivatives by *Pseudomonas putida* m10. *FEMS Microbiol Lett* 181: 137-144
- Liu, Y., Liu, X., Qu, Y., Wang, X., Li, L. Zhao, X. (2012): Inhibitors of reactive oxygen species accumulation delay and/or reduce the lethality of several antistaphylococcal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 6048-6050
- Locke, J.C.W., Young, J.W., Fontes, M., Jiménez, M.J.H. Elowitz, M.B. (2011): Stochastic Pulse Regulation in Bacterial Stress Response. *Science* 334: 366-369

- Lolić, A., Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Correia, M. Delerue-Matos, C. (2015): Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. *Science of The Total Environment* 508: 240-250
- Long, M.T., Hailes, A.M., Kirby, G.W. Bruce, N.C. (1995): Transformations of morphine alkaloids by *Pseudomonas putida* M10. *Appl Environ Microbiol* 61: 3645-3649
- Luo, G., Ono, S., Beukes, N.J., Wang, D.T., Xie, S. Summons, R.E. (2016): Rapid oxygenation of Earth's atmosphere 2.33 billion years ago. *Sci Adv* 2: e1600134
- Madyastha, K.a.R., GVB and Sridhar, GR (1998): Transformations of morphine, codeine and their analogues by *Bacillus* sp. *Indian Journal of Chemistry - Section B: Organic and Medicinal Chemistry* 37: 749-753
- Madyastha, K.M. (1994): Preparatively useful transformations of steroids and morphine alkaloids by *Mucor piriformis*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Chemical Sciences* 106: 1203-1212
- Matamoros, V., Hijosa, M. Bayona, J.M. (2009): Assessment of the pharmaceutical active compounds removal in wastewater treatment systems at enantiomeric level. Ibuprofen and naproxen. *Chemosphere* 75: 200-205
- Mishin, V., Gray, J.P., Heck, D.E., Laskin, D.L., Laskin, J.D. (2010): Application of the Amplex red/horseradish peroxidase assay to measure hydrogen peroxide generation by recombinant microsomal enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 11: 1485-1491
- Morasch, B. (2013): Occurrence and dynamics of micropollutants in a karst aquifer. *Environmental Pollution* 173: 133-137
- Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H. Fonnum, F. (2003): Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65: 1575-1582
- Mylonas, C. Kouretas, D. (1999): Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295-309
- Nagamatsu, K., Inoue, K., Terao, T. Toki, S. (1986): Effects of glutathione and phenobarbital on the toxicity of codeinone. *Biochem Pharmacol* 35: 1675-1678
- Nagamatsu, K., Terao, T. Toki, S. (1985): In vitro formation of codeinone from codeine by rat or guinea pig liver homogenate and its acute toxicity in mice. *Biochem Pharmacol* 34: 3143-3146
- Naidoo, V. Swan, G.E. (2009): Diclofenac toxicity in Gyps vulture is associated with decreased uric acid excretion and not renal portal vasoconstriction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149: 269-274

- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L. Fee, J.A. (1990): Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol* 172: 1930-1938
- Nichols, D.S. McMeekin, T.A. (2002): Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids. *J Microbiol Methods* 48: 161-170
- Niknam, S., Faramarzi, M.A., Abdi, K., Yazdi, M.T., Amini, M. Rastegar, H. (2010): Bioconversion of codeine to semi-synthetic opiate derivatives by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 119-123
- Pan, Y.-J., Lin, T.-L., Chen, C.-T., Chen, Y.-Y., Hsieh, P.-F., Hsu, C.-R., Wu, M.-C. Wang, J.-T. (2015): Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Scientific Reports* 5: 15573
- Pink, M., Verma, N., Rettenmeier, A.W. Schmitz-Spanke, S. (2010): CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis* 31: 593-598
- Ramachandra Rao, S., Tripathi, U. Ravishankar, G.A. (1999): Biotransformation of codeine to morphine in freely suspended cells and immobilized cultures of *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 465-469
- Rastogi, R.P., Singh, S.P., Häder, D.-P. Sinha, R.P. (2010): Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397: 603-607
- Rodríguez-Delgado, M., Orona-Navar, C., García-Morales, R., Hernandez-Luna, C., Parra, R., Mahlkecht, J. Ornelas-Soto, N. (2016): Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 108: 34-41
- Scoble, J., McAlister, A.D., Fulton, Z., Troy, S., Byres, E., Vivian, J.P., Brammananth, R., Wilce, M.C., Le Nours, J., Zaker-Tabrizi, L., Coppel, R.L., Crellin, P.K., Rossjohn, J. Beddoe, T. (2010): Crystal structure and comparative functional analyses of a *Mycobacterium* aldo-keto reductase. *J Mol Biol* 398: 26-39
- Sein, M.M., Zedda, M., Tuerk, J., Schmidt, T.C., Gollock, A. Sonntag, C.v. (2008): Oxidation of Diclofenac with Ozone in Aqueous Solution. *Environmental Science & Technology* 42: 6656-6662
- Semchyshyn, H., Bagnyukova, T., Storey, K. Lushchak, V. (2005): Hydrogen peroxide increases the activities of soxRS regulon enzymes and the levels of oxidized proteins and lipids in *Escherichia coli*. *Cell Biol Int* 29: 898-902

- Shin, S.H., Um, Y., Beak, J.H., Kim, S., Lee, S., Oh, M.-K., Kim, Y.-R., Lee, J. Yang, K.-S. (2013): Complete Genome Sequence of *Raoultella ornithinolytica* Strain B6, a 2,3-Butanediol-Producing Bacterium Isolated from Oil-Contaminated Soil. *Genome Announcements* 1:
- Stabler, P.J. Bruce, N.C. (1998): Oxidation of Morphine to 2,2'-Bimorphine by *Cylindrocarpon didymum*. *Appl Environ Microbiol* 64: 4106-4108
- Stott, K., Saito, K., Thiele, D.J. Massey, V. (1993): Old Yellow Enzyme. The discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. *Journal of Biological Chemistry* 268: 6097-6106
- Swissa, N., Nitzan, Y., Langzam, Y. Cahan, R. (2014): Atrazine biodegradation by a monoculture of *Raoultella planticola* isolated from a herbicides wastewater treatment facility. *International Biodeterioration & Biodegradation* 92: 6-11
- Takeuchi, R., Hoshijima, H., Nagasaka, H., Chowdhury, S.A., Kikuchi, H., Kanda, Y., Kunii, S., Kawase, M. Sakagami, H. (2006): Induction of non-apoptotic cell death by morphinone in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res* 26: 3343-3348
- Takeuchi, R., Hoshijima, H., Onuki, N., Nagasaka, H., Chowdhury, S.A., Kawase, M. Sakagami, H. (2005): Effect of anticancer agents on codeinone-induced apoptosis in human cancer cell lines. *Anticancer Res* 25: 4037-4041
- Tijani, J.O., Fatoba, O.O., Babajide, O.O. Petrik, L.F. (2016): Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 14: 27-49
- Todaka, T., Ishida, T., Kita, H., Narimatsu, S. Yamano, S. (2005): Bioactivation of morphine in human liver: isolation and identification of morphinone, a toxic metabolite. *Biol Pharm Bull* 28: 1275-1280
- Togola, A. Budzinski, H. (2008): Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J Chromatogr A* 1177: 150-158
- Torrades, F. García-Montaño, J. (2014): Using central composite experimental design to optimize the degradation of real dye wastewater by Fenton and photo-Fenton reactions. *Dyes and Pigments* 100: 184-189
- Trivedi, R.N., Agarwal, P., Kumawat, M., Pesingi, P.K., Gupta, V.K., Goswami, T.K. Mahawar, M. (2015): Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) contributes to *Salmonella* Typhimurium survival against oxidative attack of neutrophils. *Immunobiology* 220: 1322-1327
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M. Cox, J. (2016): The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*

- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M. Barceló, D. (2010): Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology* 389: 416-428
- Vilcheze, C., Hartman, T., Weinrick, B. Jacobs, W.R., Jr. (2013): *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nat Commun* 4: 1881
- Votyakova, T.V. Reynolds, I.J. (2004): Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch Biochem Biophys* 431: 138-144
- Walker, E.H. Bruce, N.C. (1996): Towards engineering an improved morphine dehydrogenase. *Ann N Y Acad Sci* 799: 6-10
- Walker, E.H., French, C.E., Rathbone, D.A. Bruce, N.C. (2000): Mechanistic studies of morphine dehydrogenase and stabilization against covalent inactivation. *Biochem J* 345 Pt 3: 687-692
- Wick, A., Wagner, M. Ternes, T.A. (2011): Elucidation of the transformation pathway of the opium alkaloid codeine in biological wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 45: 3374-3385
- Williams, J., Price, C.J., Sleet, R.B., George, J.D., Marr, M.C., Kimmel, C.A. Morrissey, R.E. (1991): Codeine: Developmental Toxicity in Hamsters and Mice. *Toxicological Sciences* 16: 401-413
- Winterbourn, C.C. (1995): Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 82-83: 969-974
- Wu, C., Fry, C.H. Henry, J.A. (1997): Membrane toxicity of opioids measured by protozoan motility. *Toxicology* 117: 35-44
- Yano, J.K., Blasco, F., Li, H., Schmid, R.D., Henne, A. Poulos, T.L. (2003): Preliminary characterization and crystal structure of a thermostable cytochrome P450 from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* 278: 608-616
- Zahradník, J., Kyslíková, E. Kyslík, P. (2016): Draft Genome Sequence of *Agrobacterium* sp. Strain R89-1, a Morphine Alkaloid-Biotransforming Bacterium. *Genome Announcements* 4:
- Zhang, Q., Rich, J.O., Cotterill, I.C., Pantaleone, D.P. Michels, P.C. (2005): 14-Hydroxylation of opiates: catalytic direct autoxidation of codeinone to 14-hydroxycodeinone. *J Am Chem Soc* 127: 7286-7287
- Zharikova, N.V., Markusheva, T.V., Galkin, E.G., Korobov, V.V., Zhurenko, E.Y., Sitdikova, L.R., Kolganova, T.V., Kuznetsov, B.B. Turova, T.P. (2006): *Raoultella planticola*, a new strain degrading 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 258-262

Zhu, X., Larsen, N.A., Basran, A., Bruce, N.C. Wilson, I.A. (2003): Observation of an arsenic adduct in an acetyl esterase crystal structure. J Biol Chem 278: 2008-2014

Zuccato, E. Castiglioni, S. (2009): Illicit drugs in the environment. Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 367: 3965-3978

9 Přílohy

V této sekci jsou zařazeny tyto přílohy:

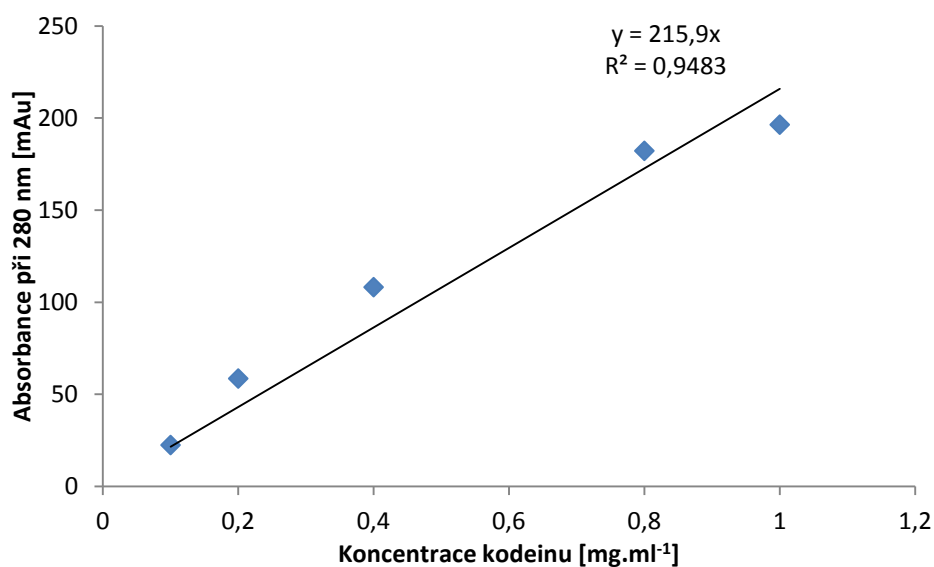
Obrázek č. S1 (str. i) – Kalibrační křivka pro analytické stanovení kodeinu

Obrázek č. S2 (str ii) – Inhibice růstu *Agrobacterium* sp.R89-1 morfinovými alkaloidy

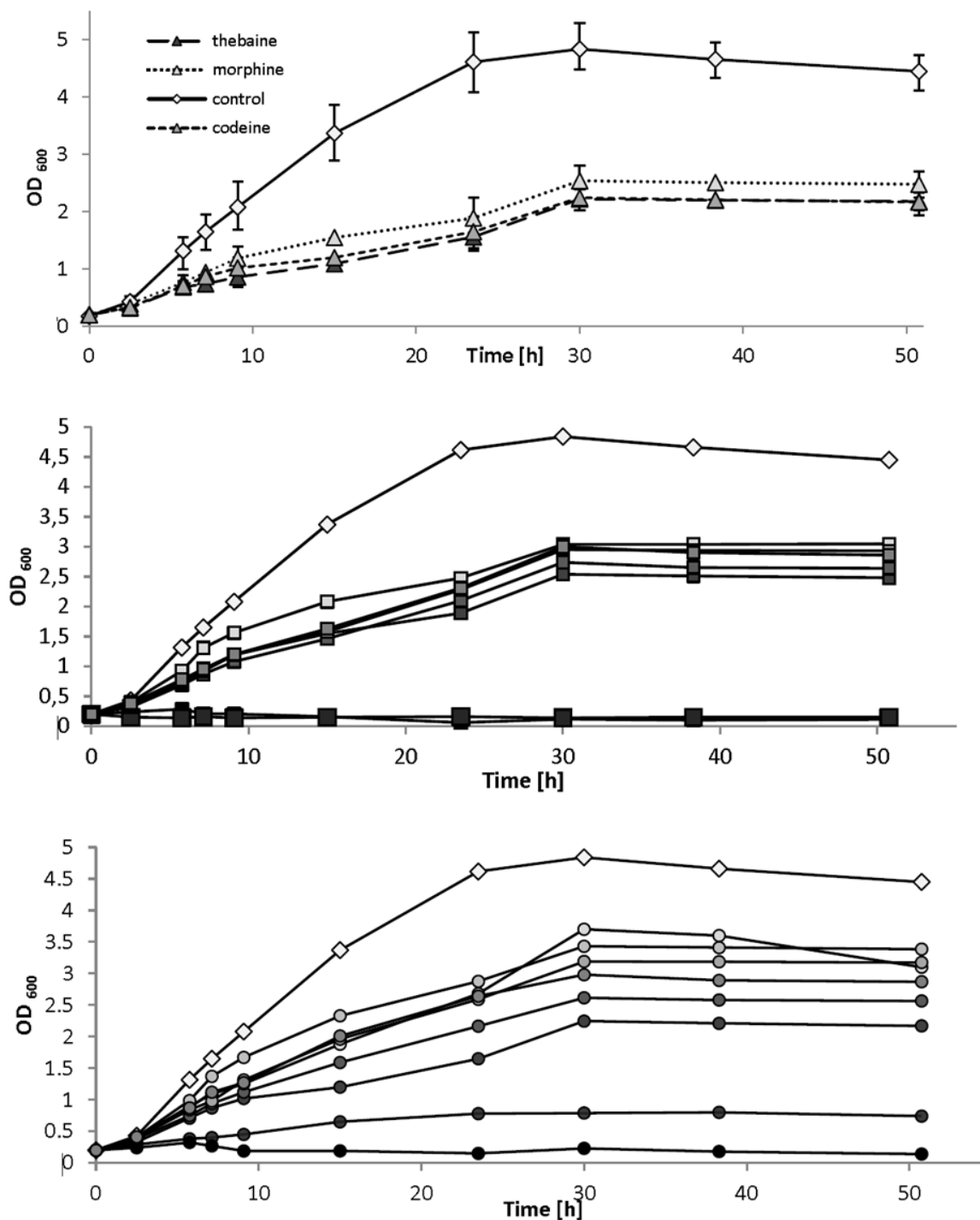
Příloha P1 (str. iii – iv) – Schematický protokol produkce, purifikace a charakterizace
N-ethylmaleimid reduktázy z *Raoultella* sp. KDF8

Příloha P2 (str. v – xxxiii) – Přípravná verze publikace charakterizující XdpB
(v anglickém jazyce)

Příloha P3 (str. xxxiv – xliv) – Přípravná verze publikace charakterizující degradační potenciál
mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 (v anglickém jazyce)



Obrázek č. S1 - Kalibrační křivka pro analytické stanovení kodeinu



Obr. č. S2 Inhibice růstu *Agrobacterium* sp.R89-1 morfinovými alkaloidy. Inhibiční vliv - Kodeinové-deriváty: ◇ kontrolní vzorek, ○ 14-OH-dihydrokodein, ● dihydrokodein, ● 14-OH-dihydrokodeinon, ● dihydrokodeinon, ● 14-OH-kodein, ● kodein, ● 14-OH-kodeinon, ● kodeinon; Morfinové-deriváty: ◇ kontrolní vzorek, □ dihydromorfin, □ 14-OH-dihydromorfinon, □ dihydromorfinon, ■ 14-OH-morfin, ■ mofrin, ■ 14-OH-morfinon, ■ morfinon; Pro přehlednost obrázku jsou zobrazeny rozptylové křivky pouze pro první graf.

Příloha P1 – Schematický protokol produkce, purifikace a charakterizace N-ethylmaleimid reduktázy z *Raoultella* sp. KDF8

Gen pro enzym N-ethylmaleimid reduktázu *nema* byl amplifikován specifickými primery navrženými na gen z *Raoultella ornithinolitica* B6 z chromozomální DNA *Raoultella* sp. KDF8 (High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche):

(šedě jsou zvýrazněna restrikční místa)

Fwd NMr: CTTAGCTCGAGTTATAACGTCCGGTAGTCGGTATAGCC

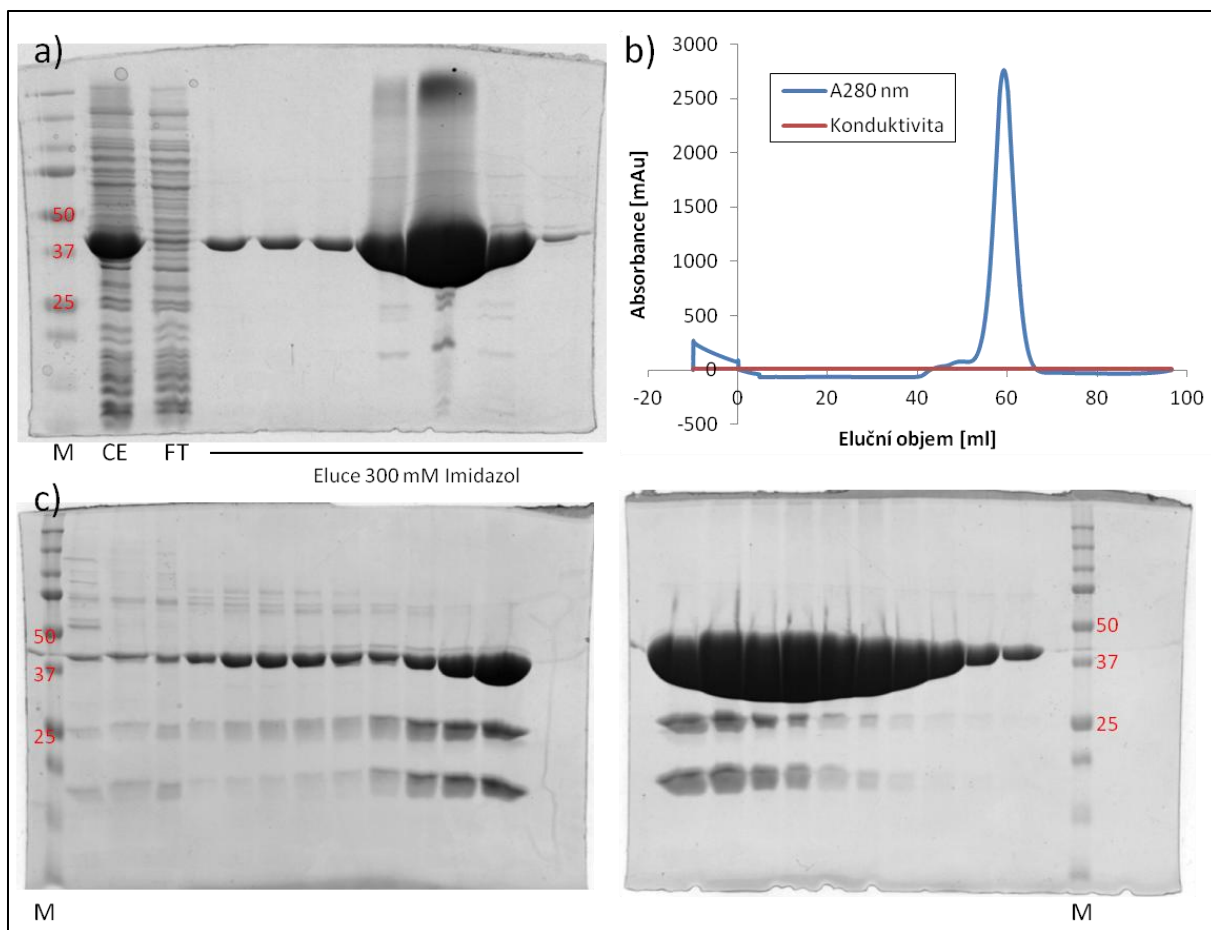
Rev NMr: TTAGTGCATATGTCCGAATCAAACTGTTTTCTCCAC

Získaný DNA amplikon (cca 1200 bp) byl separován na agarozové elektroforéze a následně byl štěpen pomocí restrikčních endonukleáz *NdeI* a *XhoI*. Štěpení bylo prováděno přes noc při 37°C. Přečištěný konstrukt byl ligován do předem štěpeného vektoru pET28b (*NdeI*, *XhoI*). Ligační směsí byly transformovány buňky *Escherichia coli* XL-1. Pomocí PCR colony s univerzálními primery pETup2 a T7 terminator primer byly nalezeny kolonie s ligovaným genem pro OYE. Správnost sekvence byla ověřena pomocí sekvenace a je ukázána níže:

```
> N-ethylmaleimid reduktáza z Raoultella sp. KDF8
ATGTCCGAATCAAACTGTTTTCTCCACTGAAAGTCGGTGCAATAACTGTACCTAACCGCGTATTATGGCTCCGCTGACGCGTCTGCGCAGTA
TCGAACCCGGCGATATCCCGACGCCGTTAATGGCAGAGTACTATCGTCAACGTGCCAGCTCCGGACTGATCATCTCCGAAGCCACGCAGATTTTC
CGCCAGGCGAAAGGCTACGCCGGCGCGCCTGGTCTGCACAGCCCGGAACAGATCGCGGCATGGCAGAAAATTACCGCCGGGGCTCACGCTGAA
CATGGCCGTATCGCCGTGCAGCTGTGGCATAACCGGTCGTATTTCCCACTCCCTGCAGCCCGGGCGGAAGCGCCGGTTGCGCCTTCTGCTA
TCAGCGCGGGCACCCGAACCTCCCTGCGCGATGAGCATGGCCACGCTATTGCGCTCGACACCTCCATGCCGCGTGCCTGGAGCTCGATGAAAT
CCCGGGGATCGTCGATGATTTCCGCCAGGCGGTCCGCAATGCCCGCGATGCCGGCTTTGACCTTGTAGAGCTGCACTCTGCGCATGGCTACCTG
CTACATCAGTTTCTGTCTCCTTCTTCCAAACCGGTACCGATCAATATGGCGGCAGCGTTGAAAACCGCGCGCTCTGGTACTGGAAGTTGTCTG
ATGCCGTGAGCAAGAGTGGAGCGCCGATCGTATCGGGATCCGCGTGTGCGCAATCGGCAGTTTCCAGAATGTCGATAATGGCCCGAACGAAGA
AGCCGATGCGCTGTATCTGATTGAAGAACTCGCCAAACGCGGCATTGCCTATCTGCACATGTCCGAGCCGGACTGGGCCGGCGGCCAGCCGTAC
AGCGACGATTCGCGCAAAAAGTGCGCGATCGCTTCCCGGGGGCGATTATCGCGCGCGCGCCTATACGGTAGAAAAAGCCAACGATCTGATCG
GCAAGGCTTAATTGATGCGGTGCGCTTCGGTCGTGACTATATCGCCAAACCCGATCTGGTCGCACGTCTGCAGCACAAGGCCGCGCTGAACCC
GCAGCGCCCTGAAAGCTTCTACGGCGCGGTGCGGAAGGCTATACCGACTACCGACGTTATAA
```

Díky tomuto postupu vznikl nový plasmid pRao nesoucí celou sekvenci genu rozšířenou o N-terminální hexahistidinovou kotvu. Z buněk *Escherichia coli* XL-1 nesoucích správný plasmid byla provedena izolace plazmidu a následně byly transformovány buňky *E.coli* BL21 (DE3). Tento kmen byl použit pro heterologní expresi. Tato exprese byla analogická postupu produkce proteinu XdpB s rozdílnou expresní teplotou – 16 °C.

Protein byl purifikován z cytosolárního extraktu buněk pomocí niklové chelatační chromatografie a gelové chromatografie (Superdex 75 16 600). Elektroforeogramy popisující standardní purifikaci jsou ukázány na následujícím obrázku:



a) Elektroforeogram niklové chelatační chromatografie. M-označuje standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein, Bio-Rad); CE – cytosolární extrak, nanáška 10 μ l; FT – nevázaná frakce na koloně, 10 μ l; b) Chromatogram gelové chromatografie Superdex 75 16/600. c) Elektroforeogram frakcí s gelové chromatografie Superdex 75 16/600.

Aktivita enzymu byla ověřena pomocí spektrofotometrického stanovení poklesu absorbance při 340 nm v reakční směsi obsahující 50 mM fosfátový pufr (pH 8,0) a substráty NADH (0,3 mM) a kodeinon (1 mM). Stanovení probíhalo za termostatovaných podmínek na 25 °C. Za těchto podmínek vykazuje enzym aktivitu 12 U. mg^{-1} (odpovídajících $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

Příloha P2 – Přípravná verze publikace charakterizující XdpB (v anglickém jazyce)

Tato publikace detailně popisuje produkci, purifikaci enzymu XdpB a jeho vlastnosti na základě biochemických, biofyzikálních a genomických metod. V této přípravné verzi publikace jsou pro čtenáře dostupné informace nutné pro hlubší porozumění regulace proteinu XdpB použité v této diplomové práci. Z důvodu zřetelného odlišení této přílohy od ostatních částí diplomové práce není dodrženo doporučené formátování a je využito odlišné typografické úpravy textu.

A crystal structure of an Apo form of glycerol trinitrate reductase XdpB, a member of a subgroup of bacterial Old Yellow Enzymes with autogenic blocking, from *Agrobacterium* sp. R89-1

Authors

Jiří Zahradník^{(1)(2)(3)*}, Petr Kolenko⁽¹⁾, Jiří Černý⁽¹⁾, Andrea Palyzová⁽³⁾, Lucie Kolářová⁽¹⁾, Eva Kyslíková⁽³⁾, Helena Marešová⁽³⁾, Michal Grulich⁽³⁾, Pavel Kyslík⁽³⁾ and Bohdan Schneider^{(1)*}

Affiliations

(1) Institute of Biotechnology CAS, v. v. i., Vestec, Prague West, CZ-252 50, Czech Republic

(2) Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University Prague, Viničná 5, CZ-128 44 Prague 2, Czech Republic

(3) Institute of Microbiology CAS, v. v. i., Czech Republic

(*) *The corresponding authors*

Abstract

The crystal structure of the apo form of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium* sp. R89-1 (XdpB) determined at 2.1 Å resolution revealed the TIM barrel fold with the N-terminal β -hairpin lid, similarly to the related bacterial Old Yellow enzymes (OYE). The active and FMN binding sites of XdpB do not contain natural cofactor FMN but a C-terminal oligopeptide from a symmetry related XdpB. Our bioinformatic analysis indicated that a similar autoinhibition can be expected in a subgroup of OYE designated as OYE C1. This subgroup of predominantly monomeric proteins bears a strictly conserved sequence GxxDYP in its C terminus, is widespread among Gram negative bacteria and have in common the mechanism of autogenic blocking. By employing experimental and bioinformatic approaches we found that proteins of the OYE C1 family are frequently coded together with other? oxidoreductases in one operon that is under the control of tetR-like transcriptional regulator. This OYE genomic organization and regulation is most frequent in Proteobacteria. When bacteria are exposed to oxidative stress, there is no upregulation of XdpB. We therefore hypothesize that the members of OYE C1 subgroup are not directly involved in oxidative stress response.

Introduction

The Old Yellow Enzyme family members (OYEs) are NAD(P)H dehydrogenases containing noncovalently bound FMN. These enzymes have been reported in bacteria, yeasts, fungi, plants and rarely in animals. There are two major reasons why researchers have focused on this protein family: firstly, OYEs exhibit ene-reductase activity that allows an effective, asymmetric hydrogenation of double bond (α,β -unsaturated) with high selectivity and reaction

yield [1] and/or nitro-reductase activity useful for bioremediation applications [2]. The potential for industrial applications is therefore evident. Secondly, a physiological role of OYEs has not yet been explained and understood. Although the first OYE was isolated as the first flavoprotein in 1932 by Warburg, a limited number of physiologic substrates known for OYEs, e.g., 12-oxophytodienoate (jasmonate biosynthesis)[3]. It is expected that OYEs take part in reductive degradation of xenobiotics, metabolic products of lipid peroxidation in a cell under oxidative stress [4], or in yeast apoptotic processes [5]. In the parasite *Trypanosoma cruzi* (Chaga's disease), the TcOYE catalyzes the reduction of Nifurtimox and other trypanocidal drugs. Research into transformation of these pharmaceuticals by OYE is, thus, crucial for development of novel, potent drugs. Another example of OYE catalysis is a single-electron reduction of menadione, performed by TcOYE [6] or catabolism of acrolein by OYE2 of *S. cerevisiae* connected with reduction of compound toxicity. The chromosome of *Escherichia coli* K-12 bears also the gene encoding OYE homologue NemaA, an N-ethylmaleimide reductase, which blocks formation of toxic products via modification of cysteine residues [7]. All cited enzymatic reactions suggest catalytic variety of OYE homologues [8].

The OYE was found to participate also in a morphine alkaloid biodegradation pathway in the strain *Pseudomonas putida* M10. The second step of the pathway, a morphinone reduction, is catalyzed by the morphinone reductase MorB (MR) belonging to OYEs [9]. Kyslíková et al. reported a hydroxylation of the codeine at C-14 by the strain *Agrobacterium* sp. R89-1 (previously classified as *Rhizobium radiobacter* R89-1, CCM 7949). Moreover, other biotransformations of the codeine were detected suggesting the presence of both metabolic steps of morphine catabolism [10]. In the follow-up study, the enzyme designated as the XdpB with MR activity and catalyzing hydrogenation of the codeinone C7-C8 double bond was identified in the genome of the strain R89-1 [11].

OYE's 3D structures are characterized by closed, central β -barrel, which ranks them into TIM barrel fold. The N-terminus of OYEs forms a typical beta-hairpin lid and loops involved in substrate and cofactor binding sites which are connected with the central β -barrel. The closest homologue to XdpB with known structure is a glycerol trinitrate reductase (GTN) NerA from *Agrobacterium radiobacter* [12] with 371 amino acid residues (UniProt O31246; identity of 56% and positivity of 71% with XdpB). The next close homologue (51% and 63%) is a morphinone reductase MorB, which has been identified for the first time as the enzyme catalyzing reduction of morphinone. However, the MorB differs from the GTN by being a homodimer.

The unknown function of XdpB prompted our interest in determining its 3D structure, which we report here. Its bioinformatic analysis led to a discovery of interesting genome organization of its regulatory region.

Methods

Media and culture conditions. Cultures of bacteria were grown in LB medium (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride; pH 7.0 adjusted before sterilization) or in expression LB medium supplemented with trace elements - LBTE (TE: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200

mg.l⁻¹, CaCl₂.2H₂O 50 mg.l⁻¹ and FeSO₄.7H₂O 10 mg.l⁻¹). Expression cultures were grown in 1 L Erlenmeyer flasks with 200 ml of LBTE medium in Max Q 4000 shaker, Barnstead, Lab-Line (250 rpm, 30°C). At OD₆₀₀ of 0.4 – 0.6, the cultivation temperature was lowered to 16°C (the host BL21(DE3)) or 10°C (the host ArcticExpress (DE3)), heterologous expression was induced by 1 mM IPTG and growth continued for 16 h (BL21(DE3)) or 24 h (ArcticExpress (DE3)). Strain BL21 (DE3) bearing Takara Chaperone Plasmid Set (Takara) were used according to the manufacturer's manual.

Construction of expression systems.

The chromosomal DNA was isolated from over night culture of *Agrobacterium* sp. R89-1 by High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). The genes were cloned by standard pET based workflow. All primers are listed in table XX. Genes were amplified by PCR reaction with the primer pair, the specific product was separated by electrophoresis, double-cut by corresponding restriction enzymes, purified (QIAquick®) and ligated by T4 DNA ligase (NEB) into precleaved vector. The ligation mixture was used to transform deep-frozen competent cells of *E. coli* XL1 Blue* and the culture was plated on LB agar supplemented with kanamycin. This procedure leads to a new plasmids which sequences were verified by sequencing. This procedure was used to produce plasmids bearing *XdpB*, *XdpA* and *XdpR* variants with His tag on C (pET26b) or N (pET28b) terminal and tag-free proteins. The plasmid from a single colony isolate, bearing the required and verified fragment was isolated by means of QIAprep® Miniprep Kit and used to transform expression hosts.

Enzyme purification. Two-step purifications were based on IMAC and gel filtration chromatography. Cells were disintegrated by sonication (Sonicator 3000, Misonix, 15-20W) in phosphate buffer (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, pH 8.0) with addition of 5 U/ml Benzonase® Nuclease, soluble fraction was separated by centrifugation (40 000g, 4 °C, 30 min) and directly loaded on gravity-flow NiNTA column (HisPur Ni-NTA Superflow Agarose). Pooled fractions with *XdpB* were finally purified in HEPES buffer (20 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 8.0) with HiLoad 16/600 Superdex 75 gel chromatography (NGC Chromatograph, Bio-Rad). Effect of His tagging on activities of the proteins was studied with crude enzyme solutions.

Crystallization and structure determination Crystallization and data processing is described in detail in Acta Cryst. F (Paper under revision). The diffraction data set was processed using the XDS program package [13]. Scaling was performed using Aimless from the CCP4 program package [14]. The structure was solved with the program BALBES [15]. Refinement was carried out with REFMAC5 [16] and manual corrections were performed using COOT [17]. The structure was validated by MOLPROBITY [18]. The coordinates and structure factors have been deposited in the PDB with accession code 5epd. All data-collection statistics and structure-refinement parameters with values for the highest resolution shell are listed in Table 2.

Table 2. X-ray data collection and refinement statistics

Biochemical characterization of XdpB. Kinetic parameters of the enzyme were determined spectrophotometrically at the wavelength of 340 nm in the reaction mixture containing NADH (concentrations ranging from 0.015 to 0.3 mM), substrate glycerol trinitrate (GTN, 0.3 to 1 mM), 50 mM phosphate buffer (pH 8) at a temperature of 25 °C. To calculate K_m , Lineweaver-Burk plot was used analogously to protocol for morphinone reductase of *P. putida* M10 [9]. The optimum for enzyme activity was determined in 50 mM phosphate buffer with pH adjusted by citrate (the range from 4.8 to 9.0) and 30-min preincubation at a temperature ranging from 15 to 30 °C. The specific activity (SA) was assayed at temperature of 25 °C with 1mM morphine alkaloid (or other substrate) and 1 mM NADH. The activity is expressed in U.mg⁻¹ protein. The activity of 1 U is the amount of the enzyme oxidizing 1 μ mole of NADH per minute. A concentration of proteins was assayed by BCA Protein Assay Kit (Pierce) and verified by Direct Detect® infrared spectrometer (Merck). Bovine serum albumin was used as a standard. Oligomeric state was assayed on Yarra SEC3000 3u column (Phenomenex) and Superdex 75 16 600 columns. The aggregation temperature of XdpB was determined by the method of Dynamic Light Scattering (Zetasizer Nano Range ZS 90, Malvern) in Precision cells with minimal volume of 20 μ l at temperature ranging from 5 to 40°C after incubation of the protein solution (0.3 mg.ml⁻¹ to 10 mg.ml⁻¹) at a given temperature for 10 min. Circular dichroism (CD) spectra were measured by Chirascan-plus spectrometer (Applied Photophysics) with wavelength steps of 1 nm (range of 185-260 nm), at 20 °C, in 0.05 cm path-length quartz cell with samples diluted with water to protein concentration of 0.2 mg.ml⁻¹. The blank (the buffer) was subtracted and the spectrum was analysed by CDNN program (citace Bohm 1992). For thermal unfolding experiments “protein melting”, the proteins with concentrations of FMN-free XdpBwt 3.3 mg/ml, flavinated protein - 2 mg/ml were used. For each condition, 10 μ l of sample per capillary were prepared. The samples were loaded into UV capillaries (NanoTemper Technologies) and experiments were carried out using the Prometheus NT.48. The temperature gradient was set to an increase of 1 °C/min in a range from 20 °C to 95 °C. Protein unfolding was measured by detecting the temperature - dependent change in tryptophan fluorescence at emission wavelengths of 330 and 350 nm. Melting temperatures T_m , where half of the protein is folded and the other half is unfolded, were determined by detecting the maximum of the first derivative of the fluorescence ratios (F330/F350).

Gel-shift assay of XdpR transcription regulator. XdpR was purified as described above. The regulatory segment of XdpR from the *Agrobacterium sp. R89-1* genome (citace) was a short double-stranded probe (26 nt) obtained as a complementary annealed primers (Fwd: CAATCATGATGATCGTCATGAATATA) with negative control mutated (Fwd: CAATTATGATGATCGTTATGAATATA). Protein XdpR with N terminal His tag was purified (0.5 mg/ml) and preincubated with DNA (20 μ M) for 1 h at room temperature. Electrophoretic separations were done in 7% PAGE gels in blue native arrangement [19]. Precision plus protein™ All Blue Prestained protein standards (Bio Rad) and XdpR with 1% deoxycholate were used as markers. The gel was stained with ethidium bromide (1 μ g/ml) in TAE buffer for 2 h and destained for 30 min. Ethidium bromide fluorescence was recorded by MF-ChemiBIS 2.0 (DNR Bio-Imaging Systems).

Reverse transcriptase qPCR. Primers were designed by means of RealTimeDesign software (LGC Biosearch Technologies, USA) and all primers are listed in Table 1.

Table 1. Primers

Primers functionalities and their concentrations (100 to 300 nM) were tested with chromosomal DNA isolated from *Agrobacterium* sp. R89-1 (for isolation protocol see Expression system construction) diluted to 2 ng DNA/ μ l in the PCR reaction: 95°C 2 min for initial denaturation and 40 times polymeration cycle of 95°C 15 s, 60°C 45 s, 72°C 30 s. Polymerase master mix 2x PCRBIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems) was used. RNA was isolated by means of High Pure RNA Isolation Kit (Roche) from the culture biomass of *Agrobacterium* sp. R89-1 grown in 50 ml of LB medium or that supplemented with codeine phosphate (dissolved in DMSO to final concentration of 1g/L) from exponential, early and late stationary growth phases. cDNA was synthesized by Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) on all isolated RNA templates. Concentration of cDNA was determined with Nanodrop 100 (Thermo Scientific) and diluted to the final concentration of 2 ng cDNA/ μ l. qPCR reaction was performed using StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) in the reaction mixture (volume of 20 μ l) containing 4 ng cDNA and primers at concentration of 200 nM. The reaction cycle: 2 min 50°C, 2 min 95°C, followed by 40 times (95°C 15 s and 60°C 1 min). Data analysis was performed by the StepOne Software (Applied Biosystems), using the Relative Quantitation/Comparative CT ($\Delta\Delta$ CT) setting. The sample of culture LB0 grown in LB medium (13.5 h) was used as a reference and the *coxA* gene served as an endogeneous control. All experiments were done in independent triplicates.

Sequence-structure bioinformatics. The UniProt and PDB databases were searched with the amino acid sequence of XdpB as a query to select 150 sequences that were subjected to multiple sequence alignment (MSA) by the ClustalW algorithm as implemented in Ugene program [20] or MEGA 6 [21]. Structural comparison was prepared by MatchMaker implemented in UCSF Chimera software (version 1.10.2) [22]. The binding of the C-terminal pentapeptide TTSDN in the active site of the symmetry-related molecule was analyzed using LigPlot+ [23] with the symmetry-related pentapeptide as a ligand. GenBank was searched by blastp and DELTA blast tool [24]. Bacterial Operon and Gene Prediction was done by Software FGENESB [25]. Operator-like sequence characteristic for TetR family proteins were searched by results of Deng et al. [26] and promoters was analyzed by the method of MacLellan [27].

Results

XdpB structure

The XdpB protein was purified as an Apo form (Figure 2b), crystallized and the crystal structure was determined to 2.1 Å resolution in the space group P2₁2₁2₁ with one protein chain in the asymmetric unit. The first amino acid residue localized in the electron density map was Thr5. Two loops between Gly267 and Ala276 and between Asn295 and Phe97 could not be resolved due to a low quality of the electron-density map of these regions. The core of

the structure is formed by the TIM barrel fold with 8 parallel beta-strands surrounded by several alpha-helices (Figure 2a). As in other homologous structures, the active site of XdpB is formed by the residues His176 and Asn179, the latter being an H-bond donor. The other residues in the active site pocket are Tyr181, Tyr68 and Phe345. Thus, the whole active site arrangement is similar to that of NerA [28]. A comparison of flexibilities of the XdpB and NerA crystal structures (PDB ID 4jip [12] by juxtaposing their scaled B-factors [29] showed that the structure of XdpB is more flexible which corresponds to more psychrophilic character which is supported by XdpB low crystallization temperature 281 K (289 K for NerA). Surprisingly, the beta-hairpin lid of the TIM barrel as well as the N-terminal cap are less flexible in the XdpB than in NerA (Supplementary Figure S1) which is in contrast to known structures.

C terminal peptide interactions with amino acids of the active site

Protein structure analysis revealed that putative FMN binding site of XdpB contains a C-terminal pentapeptide (TTSDN) of the symmetry-related molecule (Figure 2a, 2c). The active site pocket contains isolated electron density regions that corresponds to a network of 8 hydrogen-bonded water molecules (Fig.2c). The pentapeptide binds to the amino acid residues lining the FMN site of another monomer molecule by rather complex network of interactions: 10 hydrogen bonds, 4 water bridges, one CH- π interaction with the total interaction area of about 86 Å². Position of Asn365 carboxamide group nicely fits with predicted isoalloxazine ring C2 carbonyl and nitrogen N3 because predicted distance of these atoms does not exceed 0.4 Å. Carboxy group of D364 also fits to the predicted position of isoalloxazine ring and is strongly interacting with R318. A “pseudo-dimer” is formed and the “train” like arrangement of XdpB monomers to oligomer is thus defined. Figure 2d and 2e shows these interactions in detail.

Figure 2. Structure of the XdpB “pseudo-dimer”.

Oligomerization and the effect of enzyme flavination

Similarly to the crystal structure, during expression, purification and enzyme kinetics study we observe various effects connected to FMN content and putative oligomerization in solution. The FMN content in heterogeneously expressed XdpB is highly variable on construct (C or N terminal his tag, $\Delta 5$ variant – the last 5 amino acids TTSDN deleted) and expression system. Highest molar percentage of XdpB flavination (up to 80 %) was determined in XdpB $\Delta 5$ purified enzyme and with a His tag attached to the C terminus. High FMN content (60±10 %) was also determined with XdpB Nhis culture of the host BL21(DE3) after induction with 1mM IPTG (growth temperature of 20°C). Under these conditions, however, the protein was mainly found in inclusion bodies. The protein was completely soluble when synthesized at 10°C in the strain Arctic Express(DE3), but the flavin content represented only 8-17 % of the expected concentration. No change of this value was observed for non-tagged constructs. Considerable increase of FMN content was achieved by coexpression with groES/groEL chaperones born by plasmid pGro7 (Takara, Chaperone Plasmid Set). To study

binding capacity of the enzyme for FMN, we supplemented directly the culture medium by 1 mM riboflavin. Nevertheless, the FMN content in the purified enzyme increased only to 30%. The only way to get XdpB saturated with FMN (above 80 %) was the direct addition of a pure protein to 10 mM FMN solution, the overnight incubation at 4°C and then the removal of excess FMN by gel chromatography.

An oligomeric state of the pure protein (non-reflavinated) was analyzed by SEC-HPLC and standard gel filtration chromatography: XdpB was found to be a monomer (41 kDa). This finding was verified by MALDI-TOF MS and no molecules with higher mass representing the oligomers were detected. By dynamic light scattering we observed that z-average diameter of a molecule is as much as twice longer (23 ± 5 nm) than it is expected for XdpB (8-12 nm) and the diameter of the molecule is concentration dependent. The protein aggregation started at the temperature of 28 °C as determined by light scattering and the aggregation seems to be partially reversible by sample cooling. Addition of 5 mM FMN into enzyme solution or the use of *in vitro* flavinated protein suppressed the oligomerization process described above. *In vitro* flavinated form also exhibited slightly increased stability. The melting temperature of 44 °C and 39 °C was determined by ThermoFluor method for apo form and *in vitro* flavinated form, respectively. The values were verified by nanoDSF Prometheus NT.48 instrument melting with 38.9 and 39.8 °C values. The CD spectra for both enzyme variants are identical which suggests proper and same folding for both variants. Results are shown in Figure 1.

Figure 1. The melting temperatures of XdpB.

The XdpB monomer contains a single cysteine (Cys240) on the molecule surface and we identified a dimer formation in oxidizing environment with reduced activity (20 %). The dimer existence was confirmed in *E. coli* Shuffle (DE3) expression system by means of SDS-PAGE (Figure 2b) and proven by Anti His Western blotting (BD Pharmingen, Monoclonal Mouse anti-His tag antibody). A multiple sequence alignment (MSA) of Cys240 in close XdpB homologues shows that the position is variable with predominant occurrence of Gly or Ser. The cysteine is present in approximately 10% of homologues, which is the highest frequency among all residues in MSA analysis. Unexpectedly mutation C240S decreased the yield of soluble XdpB to one third. Therefore, we used always the reducing buffers in further studies.

XdpB kinetics

The level of flavination dramatically affected enzyme activity which corresponds to the literature data on OYE enzymes [12]: the pure protein with low FMN content shows low residual activity. Therefore, the enzyme kinetics was studied with reflavinated protein and the data were recalculated to the values for FMN saturated protein. We determined activity maximum at a temperature of 25°C and pH 8-9. The stability maximum was determined by ThermoFluor method and we found that the enzyme has the highest stability at HEPES buffer (100 mM) and salt concentration ranging from 200 to 500 mM. Under these conditions, the specific activity of XdpB for GTN equals 8 U.mg^{-1} and the $K_m^{\text{GTN}} = 460 \pm 32 \text{ }\mu\text{M}$ which is in a good agreement to the value for NerA ($705 \pm 74 \text{ }\mu\text{M}$ [28]). The K_m^{NADH} equals $6 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$. The specific activities (pH 8, 25°C) for other substrates are as follows: codeinone $15.3 \pm 0.7 \text{ U.mg}^{-1}$, morphinone $6.5 \pm 0.4 \text{ U.mg}^{-1}$, and cyclohexenone $4.5 \pm 1 \text{ U.mg}^{-1}$.

Structure-based alignment of OYE proteins

To explain unusual binding of the C terminus of XdpB, we have performed a structure based alignments of OYEs with the available 3-D structures. Identical structures to XdpB (5epd) have OYE1 of *Saccharomyces pastorianus* (1bwk [30]), EasA of *Aspergillus fumigatus* (4qnw[31]), SYE1 of *Shewanella oneidensis* (2gou [32]), Ncr of *Zymomonas mobilis* (4a3u [33]), TcOYE of *Trypanosoma cruzi* (3aty [34]), PETN of *Enterobacter cloacae* (1h51)[35], NerA of *Agrobacterium radiobacter* (4jic [12]), and OPR3 of *Solanum lycopersicum* (2hsa [36]). We named this subgroup as OYE C1. In these enzymes (Figure 3a), the C terminus has a sequence GytDYPTl (in capitals strictly conserved amino acids, preferred residues in low cases) and the enzymes have a high 3-D structure similarity (Fig.3a). Root mean square deviation (RMSD) value for the sequence GytDYPTl is 0.741 Å and averaged value for the protein core (including residues T5-Q113, E142-P234, D242-D255, G258-V265; the XdpB numbering) equals 0.983. Based on AA sequence, we in total identified and compared 150 OYE homologous enzymes to XdpB. The majority of identified proteins were annotated as a glycerol trinitrate reductases, N-maleimide reductases or alkene reductases. Nearly 36% of these sequences bear the octapeptide GytDYPTl as a C terminus and the rest bears the sequence that is longer by 1 up to 7 amino acids, predominantly Glu, Ala, Ser, Thr, Asn and Gln.

Figure 3.

We also identified a subgroup of OYE proteins that differ XdpB and do not contain GytDYPTl motif. This second subgroup was designated as OYE C2. As representatives of this sub-group with known 3-D structure we can name the protein YqjM of *Bacillus subtilis* (1z41)[4], TOYE of *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* E39 (3kru [37]), XenA of *Pseudomonas putida* 86 (3l5l,[38]), Oye of *Geobacillus kaustophilus* (3gr8 [39]) and also proteins so far not structurally characterized, e.g., OYE from *Corynebacterium glutamicum* [40].

Bioinformatics of the xdo operon.

The analysis of the genome of the strain *Agrobacterium* sp. R89-1 revealed that the *xdpB* gene forms together with gene *xdpA* (short chain dehydrogenase) an operon that was designated by us as a xenobiotics degradatory operon (*xdo*). A DNA fragment bearing this operon was obtained together with neighboring sequences by PCR techniques, sequenced (access number KM272590) and NT sequences were verified by Illumina whole genome sequencing (access number LNUW000000000, [11]). We found that the operon is under the control of a transcriptional regulator from TetR family that precedes the operon in the reverse orientation and was designated as *xdpR* (Figure 4b). The structural genes *xdpA* and *xdpR* were independently subcloned into expression vectors and recombinant plasmids with full length proteins were obtained, expressed in *E.coli* ArcticExpress (DE3) host and characterized in detail.

Biochemical characterization of XdpA

By sequence homology, we found that the XdpA protein belongs to NADB Rossmann superfamily and is a short chain dehydrogenase (SDR). Blast search was not clear but the alignment of 50 members SDR and 50 members of AraC family support assertion that XdpA is a SDR rather than AraC regulator. The alignment is in simplified form shown as a Supplementary material S6.

Using SDS PAGE and gel filtration chromatography (Supplementary Figure S2), the enzyme XdpA was found as a homodimeric short chain dehydrogenase (55 kDa) of a subunit with 262 AA (27.6 kDa). The melting temperature of 38.5 °C was determined by ThermoFluor method and purified protein was found to quickly aggregate at the room temperature. We attempted to find any activity of the substrates associated with the metabolism of codeine and other available alcohols. The XdpA did not exhibit any dehydrogenase activity with substrates codeine, morphine, crotonaldehyde, allyl alcohol, n-butanol, isobutanol, cyclohexanol, or 4-hydroxybenzoic acid in a phosphate buffer system (pH 6-8) supplemented with NAD⁺ or NADP⁺.

Biochemical characterization of XdpR transcriptional regulator from TetR family

We predicted the transcriptional regulation of *xdo* operon by the XdpR regulator using bioinformatics and verified by *in vitro* experiments (gel-shift assay). Promotor-transcriptional start sequences of *xdo* operon and *xdpR* gene were analyzed by MacLellan method [27] together with identification of an operator-like DNA sequence recognizable by TetR family proteins [26]. The results are schematically represented in the Figure 4c: a predicted binding NT sequence TCATGA(6NT)TCATGA recognizable by XdpR overlaps -35 region common for the *xdpR* promoter and *xdo* operator sequences (Fig. 4 b). Same regulation sequence can be found on the genome of related *Agrobacteria* (C58 strain; gb|AE007872.2 and H13-3 strain;gb|CP002249.1) although the neighboring sequence are mutated with identity values 83% and 80% respectively. This conserved region contains not only NT sequence TCATGA(6NT)TCATGA, but also the neighbouring nucleotides (5-7).

XdpR regulator was purified, oligomeric state of the active protein was determined by PAGE electrophoresis (Fig. 4a) and gel filtration (Supplementary Figure S2): this regulator protein is a homodimer with molecular mass of 37 kDa (19 kDa for monomer). After the NiNTA chromatography, we have observed a rapid oligomerization.

The binding of XdpR to the operator site was confirmed by a gel-shift assay (Fig. 4). Blue-native electrophoresis had to be used to overcome obstacles connected with stability and mobility of XdpR in a native gel. Although this technique reduces the assay sensitivity for UV fluorescence of ethidium bromide, clear increase of UV fluorescence and marked reduction of fluorescence of free DNA in a positive sample was observed. Negative control experiment where potential effector binding sequence was mutated showed reduced binding of the protein to DNA. The role of XdpR as an effector molecule regulating *xdpA* and *xdpB* expression could be therefore expected.

Figure 4. Gel-shift assay of *xdo* operon.

Physiological function of XdpB

Being classified as OYE member, the involvement of XdpB in answer of the bacterial cell to the oxidative stress was studied by RT-qPCR experiments in terms of the gene relative transcription. The transcriptome of the culture of the strain *Agrobacterium* sp. R89-1 grown in LB medium (a reference sample) was compared with that grown in LB medium supplemented with the codeine, a precursor of the codeinone and substrate of the XdpB, that elicits oxidative stress.

We have found by RT-qPCR experiments similar expression levels for the gene *xdpR* under both growth conditions. Although the gene *xdpB* was not overexpressed in the presence of codeinone, the data on upregulation under these growth conditions implicitly indicate the oxidative stress presence: transcription of the *katG* gene encoding peroxidase and genes *trx1* and *gshB* was upregulated more than nine times and four-times, respectively. No upregulation was observed for *sodBI* (Supplementary figure S4).

Discussion

Although there are almost 100 reports on structures of Old Yellow Enzymes, their physiological role and structure-function relations are not well understood. We have characterized a new monomeric OYE enzyme XdpB of the strain *Agrobacterium* sp. R89-1 and classified it as a glycerol trinitrate reductase. We suggest that the enzymes XdpB and NerA belong to the same kinetics group [28] due to the following reasons: 1. parameter K_m of the XdpB for glycerol trinitrate is similar to that of glycerol trinitrate reductase from NerA, 2. amino acids involved in the mechanism of catalysis in both enzymes are almost conserved, and 3. the cofactor interacts with identical residues in both enzymes except residues A58, K329 and F345 identified in the XdpB. A list of OYE enzymes with glycerol trinitrate activities is given in the Table 3. The nitroester reductases belongs to OYE C2 subgroup and all other enzymes are members of the OYE C1 subgroup that was classified by us in this work.

Table 3. Microbial OYE enzymes with glycerol trinitrate activity

The structure of XdpB apo form was solved and unique structural feature discovered. The C-terminal pentapeptide TTSDN was found to be tightly bound to FMN binding region of another enzyme molecule. The C-terminal pentapeptide (TTSDN) intermolecular interactions could mimic the binding of FMN at the active site. We conclude that from superimposing the NerA structure over the XdpB structure: RMSD between 321 atom pairs is only 0.719 and the FMN binding site residues are identical. Moreover, the FMN binding site is highly conserved among OYE (Figure 3a). The network of interactions of TTSDN peptide of the XdpB suggests a lower affinity to the cofactor binding site.

We have found two major attributes for XdpB in solution supporting the interaction observed in the crystal structure. The purified enzyme has very low molar content of FMN and there are concentration dependent capability for interaction/aggregation. Marshall et al. [28] reported “*in vivo*” apo form production with heterologously overproduced glycerol trinitrate reductase NerA but without detailed analysis. We showed, that even if riboflavin was added to the XdpB producing culture as a direct precursor for FMN synthesis, the FMN-free and inactive enzyme is finally obtained after purification. Therefore we hypothesize that the FMN synthesis

is not limiting for the FMN content. Moreover, XdpB Chis and XdpB Δ 5 variants with blocking and missing C terminus respectively, showed higher FMN content than the wild type under the same conditions.

The second characteristic feature, capability for interaction/aggregation, was observed by DLS for concentrated solutions and also with elevated temperature (25-28 °C). This is not typical for *in vitro* flavinated form and also for construct with blocked C terminus. We have very carefully assessed the folding of the enzyme: the CD spectrum and melting curves analyzed by different methods showed that 1. the protein was correctly folded and no degradation occurred and 2. the stability of the XdpB fully saturated with FMN is similar to the apo form (a shift of T_m by 1 °C). Thus, the observed aggregation is not associated with protein denaturation.

Both above described phenomenons can be explained by reversible aggregation of the monomers caused by C terminal interactions. Therefore, we believe that *in vivo* formation of apo form is a natural characteristic for the XdpB enzyme rather than an artefact of heterologous overexpression and purification. This also means that the C terminus intermolecular interaction occupying FMN binding site prevents holoenzyme formation *in vivo*. We hypothesize (as in the case of OPR3 (2hsa)) that phosphorylation of a specific residue may prevent intermolecular “C-terminus - FMN binding site” interactions and, therefore, the enzyme activity can be tightly regulated.

Unusual structure and enzyme properties has led us to deeply investigate OYE sequences and structures in order to find if the described phenomenon is widespread or not. We founded that similar autogenic blocking reported here by us for XdpB has been observed in the crystal structure of an OYE OPR3 from the plant species *Solanum lycopersicum* (PDB code 2hsa [36]). However, the mode of the active site blocking in the OPR3 is completely different from that in the XdpB: in the former, an intrinsic loop Gln289-Ala292 of a monomer binds to the active site pocket of the second one without the FMN removal, thus sterically blocking the active site pocket. The second result of our search was that OYE proteins can be divided into two subgroups. Although the majority of OYE proteins structure is the same, C terminus showed significant differences with the impact on the properties of the proteins. We designated these two subgroups as a OYE C1 and OYE C2.

The subgroup OYE C1 consists of mainly monomeric proteins bearing C terminal loop with GytDYptI sequence motif. The members may exhibiting the mechanism of intermolecular blocking. Multiple sequence alignment of members suggests the presence of two types of interactions. Long C terminal sequences may allow similar interaction as in the case of the XdpB. We identified also an insertions in the same loop as in the case of OPR3 which may also mediate blocking (See supplementary Figure S3). Our search through the PDB database shows that most of the XdpB-homologous proteins have been heterologously produced with C-terminal His-tags and could not therefore exhibit self-blocking of the FMN site observed in our structure (5epd). Therefore, we suggest that this phenomenon is more common in OYE C1 subfamily, is of yet unknown biological significance and may be observed when OYEs are purified and crystalized without C-terminal tags, e.g., the EasA from *Aspergillus fumigatus* PDB ID 4qnw [31]) or GYE from *Gluconobacter oxydans* (PDB ID 3wjs). The literature data

suggest a possible role of enzymes of this subgroup in apoptosis [5], alcohol stress [41] or oxidative stress [42]. The XdpB and SYE2 of *Shewanella oneidensis* are not upregulated at oxidative stress response. The N-ethylmaleimide reductase from *Escherichia coli* K12 by NemR suggests involvement in the response to alkylation with chemical agents [43]. Therefore, we believe in another physiological function of OYE C1 proteins, not directly involved in oxidative stress response and different from OYE C2.

OYE C2 subgroup embraces predominantly OYEs of Gram-positive bacteria with dimeric or tetrameric structures. These enzymes are well characterized as regards the transcription and translation processes and they are, in certain respects, related to the oxidative stress, e.g., the YqjM from *Bacillus subtilis* [4] and SYE4 from *Shewanella oneidensis* [44]. The CyeR from *Corynebacterium glutamicum*, a redox-sensing transcriptional regulator of OYE from regulator family ArsR [40], was characterized. Another member of the subgroup, a YqjM, has already been classified based on amino acids C26, Y28, K109, and R336 involved in active site. The enzyme is a homotetramer with C terminus taking part in homotetramer formation instead of autogenic blocking. Intermolecular interaction "C terminus - YqjM active site" mediated by active site residue Arg336 has been described. In another enzyme XenA (3n19 [45]) of C2 subgroup, the amino acid W358 is responsible for this interaction. However, these interactions do not cause reduction of activity and are more likely involved in active site pocked formation. The different mechanism of subunit interaction/oligomerization between OYE C1 and C2 subgroups is therefore evident. For deeper understanding, it requires further investigation in a context with physiological functions.

In an effort to contribute to understanding of OYE proteins we also focused on genomic organisation of XdpB protein and its regulation. We found that XdpB, like many other OYE C1 proteins, is located in the *xdo* operon controlled by tetR-like regulator designated as a XdpR. Operon *xdo* is widespread mainly among *Proteobacteria*: a single copy of *xdo* operon is present in genomes of microorganisms, e.g., *Rahnella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas*. The operon was also identified on Ti plasmid pTiBo542 of *Agrobacterium tumefaciens* (GenBank: DQ058764). In all cases, the operon consisted of the tandem genes encoding OYE and: 1. a short chain dehydrogenase frequently miss-annotated as AraC transcriptional regulator (see supplementary material figure XX), 2. aldehyde dehydrogenase (*Polaromonas naphthalnivorans* CJ2; NC_008781) or 3. Zn-alcohol dehydrogenase (*Ralstonia pickettii* 12J; CP001068). All these operons are under the control of the tetR family transcriptional regulators and we expect, that the enzymes take part in a single metabolic pathway. Exceptions might be present in microorganisms with more than one OYE in the genome like proteins sye1 and sye2 from *Shewanella oneidensis* MR-1 or in XdpB phylogenetically distant members of OYE C1 like N-ethylmaleimide reductases.

Conclusions

In this report, we characterized and classified XdpB as a glycerol trinitrate reductase (GTNR) by its sequence homology, substrate specificity, and by determining its 3D crystal structure. We have solved the crystal structure of XdpB from *Agrobacterium* sp. R89-1 at 2.1 Å resolution (PDB 5epd). The structure reveals the common TIM barrel fold similarly to other

OYE proteins but it also exhibited two unique features. The non-covalently bound FMN cofactor is missing and the C-terminal pentapeptide region is tightly interacting with the crystal symmetry related molecule at the FMN binding site.

Using biochemical and biophysical methods on XdpB with different His tag position and shortened variant XdpB Δ 5 we identified that XdpB is produced preferably as a FMN-free form and at high concentration exhibits self-interaction (aggregation) without an impact to structure or stability. We therefore conclude that self-interaction is not an artifact caused by heterologous overexpression and crystallization and has some biologic relevance.

By structure based bioinformatics we distinguished two subgroups of OYE enzymes based on different C terminus sequence. Subgroup OYE C1 characterized by the mechanism of self-blocking, represented by the XdpB, a monomeric enzyme with large extended C terminal bearing conserved motif GxxDYP and by previously described OYE protein OPR3. Physiological function of this subgroup is yet unknown but as our results indicated they are not directly involved in the response to oxidative stress. In contrast, subgroup OYE C2 bears dimeric or tetrameric proteins, mainly from G⁺ bacteria and involved in the cell response to oxidative stress.

We founded that OYE C1 enzymes similar to XdpB are accompanied with an oxidoreductase to form conserved *xdo*-like operons found in a single copy mainly in *Proteobacteria*. The operons are under regulation of tetR-like repressors (*xdpR*) which was proved by gel shift assay and as our qPCR data indicates, the enzymes encoded by structural genes are not involved in the direct response to the oxidative stress.

Acknowledgements

The study was supported by grant No. 720414 of the Grant Agency of Charles University, BIOCEV CZ.1.05/1.1.00/02.0109 from the ERDF, and by the long-term research development project RVO 61388971 to Institute of Microbiology CAS, v. v. i. and 86 652 036 to Institute of Biotechnology. We thank Dr. M. Šulc for mass spectrometry measurements (Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic).

We thank the Helmholtz Zentrum Berlin for the allocation of synchrotron radiation beamtime.

Table 1.

Beamline	HZB, Bessy II, MX 14.2
Wavelength (Å)	0.91841
Resolution range (Å)	47.36 - 2.10 (2.16 - 2.10)
Space Group	P 21 21 21
Cell parameters (Å)	54.88, 68.60, 93.68
No. of observations	74,784 (4,185)
No. of unique reflections	20,170 (1,469)
Multiplicity	3.7 (2.8)
Mean I/σ(I)	13.0 (2.1)
R _{merge}	0.068 (0.358)
CC _{1/2}	99.7 (82.8)
Wilson B value (Å ²)	19.7
Refinement	
Reflections: working/free	19,114/1,012
Protein atoms	2632
Waters	221
R _{work} /R _{free}	0.198/0.262
R _{all}	0.201
Ramachandran plot	342/348 (98%)
favored	330 (96%)
allowed	12 (4%)
disallowed	.0
R.m.s. bond distance deviation (Å)	0.011
R.m.s. bond angle deviation (°)	1.417
Mean B factors: protein/solvent/overall (Å ²)	37/38/37
PDB accession code	5epd

Table 2. List of primers

Expression system construction primers					
Construct		Plasmid	Primers		
XdpB CHis	pET26b	fwd: TTTCATATGACCAAGACCACACTCTTCC, rev: TTTGAATTCTATTGTCGGACGTTGTTT			
XdpB WT	pET26b	fwd: TTTCATATGACCAAGACCACACTCTTCC, rev: TTTGAATTCTCAATTGTCGGACGTTGTTT			
XdpBA5	pET28b	Fwd: GATTTTCATATGACCAAGACCACACTCTTCC, Rev: TATGAATTCTCATTGCGAAAAGCGGGG			
XdpBA5 CHis	pET26b	Fwd: GATTTTCATATGACCAAGACCACACTCTTCC, Rev: TATGAATTCTCATTGCGAAAAGCGGGG			
XdpBWT C240S	pET26b	Fwd: CAACGGTATTTCTCCAGTGATCCCCAGAC Rev: GTCTGGGGATCACTGGAGGAAATACCGTTG			
XdpBA5 C240S	pET26b	Fwd: CAACGGTATTTCTCCAGTGATCCCCAGAC Rev: GTCTGGGGATCACTGGAGGAAATACCGTTG			
XdpA WT	pET26b	Fwd: TTTTCATATGACTCAGATTCCCTTAGTCTTG, Rev: AAATGCTCGAGTCACGCCGGCGTCCGATAGCGTT			
XdpA NHis	pET28b	Fwd: TTTTCATATGACTCAGATTCCCTTAGTCTTG, Rev: AAATGCTCGAGTCACGCCGGCGTCCGATAGCGTT			
XdpA CHis	pET26b	Fwd: TTTTCATATGACTCAGATTCCCTTAGTCTTG, Rev: AAATGCTCGAGTCACGCCGGCGTCCGATAGCGTT			
XdpR WT	pET26b	fwd: GACTACATATGAAAGTCAGTCGAGAACAGATGGC, Rev: AAATCCGAATTCCTACTCCACCTGCGTGTCGATCC			
XdpR NHis	pET28b	fwd: GACTACATATGAAAGTCAGTCGAGAACAGATGGC, Rev: AAATCCGAATTCCTACTCCACCTGCGTGTCGATCC			
XdpR CHis	pET26b	fwd: GACTACATATGAAAGTCAGTCGAGAACAGATGGC, Rev: AAATCCGAATTCCTACTCCACCTGCGTGTCGATCC			
RT q PCR Primers					
Function	Name	Orientation	5'- - 3' Sequence	Amplicon (bp)	GenBank/UniProt number
reference genes	atpD	F	AGCTACCCCAAAGAAAACCG	118	KXG85648.1
		R	TGTCAGTCTCAATCGCGTTG		
	recA	F	GGCTCGCTCAGCCTTGATG	84	KXG86763.1
		R	CGGAGCTTTCCGGTCCATA		
	coxA	F	CGACCGTTCTCTGCATGACA	63	KXG87943.1
		R	CCCAGCGACAGCACGTAA		
	proC	F	GACCGAAGCACCGAAGAATG	77	KXG85914.1
		R	AGGACCGCATCCATCAACTGA		
oxidative stress markers	rpoD	F	TCGCATCTGGGTGACTTCATC	73	KXG85954.1
		R	CGCAGGTTGGCCTGAATGG		
	sodBI	F	CAGGCATTTCGCTCTGATCTC	86	KXG88030.1
		R	CCAGCCGGAACCAAACTGT		
	katG	F	CGATGGCTTCCGCAACTTC	97	KXG85283.1
		R	GCCCTGTCTAGCGTGAGAA		
	trxA	F	CCGTGAAAGTCGATACGTCAAAC	87	KXG85552.1
		R	CCACACCATTACAGCCAGAA		
	gshB	F	CGCGATGACCGCAACTTC	91	KXG84280.1
		R	CGAACGTCGGGCAGATACTG		
codeine metabolism	xdpB	F	CCAGACGCAGTACGATTACATTG	85	A0A0A0VDJ9
		R	GTCCGCCGGTAGCACCTT		
	xdpR	F	CAACGTCTGCGCGACAAGA	75	A0A0A0VAX9
		R	GAAGGCCGCCGGTATGAC		

Table 3.

Microorganism	Protein	Activity GTN [U.mg ⁻¹]	°C	Ref.
<i>Pseudomonas putida</i> II-B	Nitroester reductase	124 ± 6	25	[46]
<i>P. fluorescens</i> I-C	Nitroester reductase	110 ± 11	25	[46]
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Glycerol trinitrate reductase, NerA	3,1 ± 0,1	30	[47]
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	GTN	15,02*	Rt	[48]
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	PETN reductase	12,1 ± 0,5	Rt	[49]
<i>Enterobacter cloacae</i>	PETN reductase	35,5 ± 3,1	30	[50]
<i>Escherichia coli</i>	NEM reductase	37,9 ± 5,3	30	[50]
<i>Agrobacterium sp.</i> R89-1	XdpB	8,2**	25	

* The activity was assayed with GTN in absence of NA(P)DH.

** Activity recalculated to XdpB fully saturated with FMN

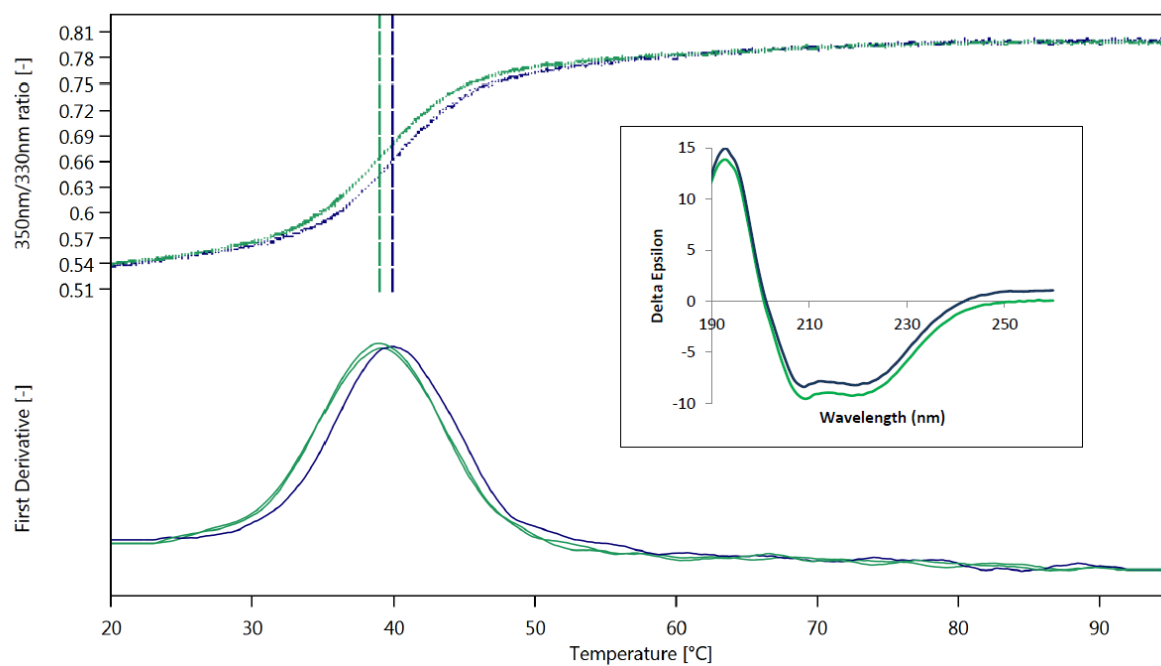


Figure 1. The melting curves from nanoDSF Prometheus NT.48 instrument with spectra first derivative and Circular dichroism spectra (inset) for apo form (in green) and “*in vitro*” flavinated form (in dark blue) of XdpB.

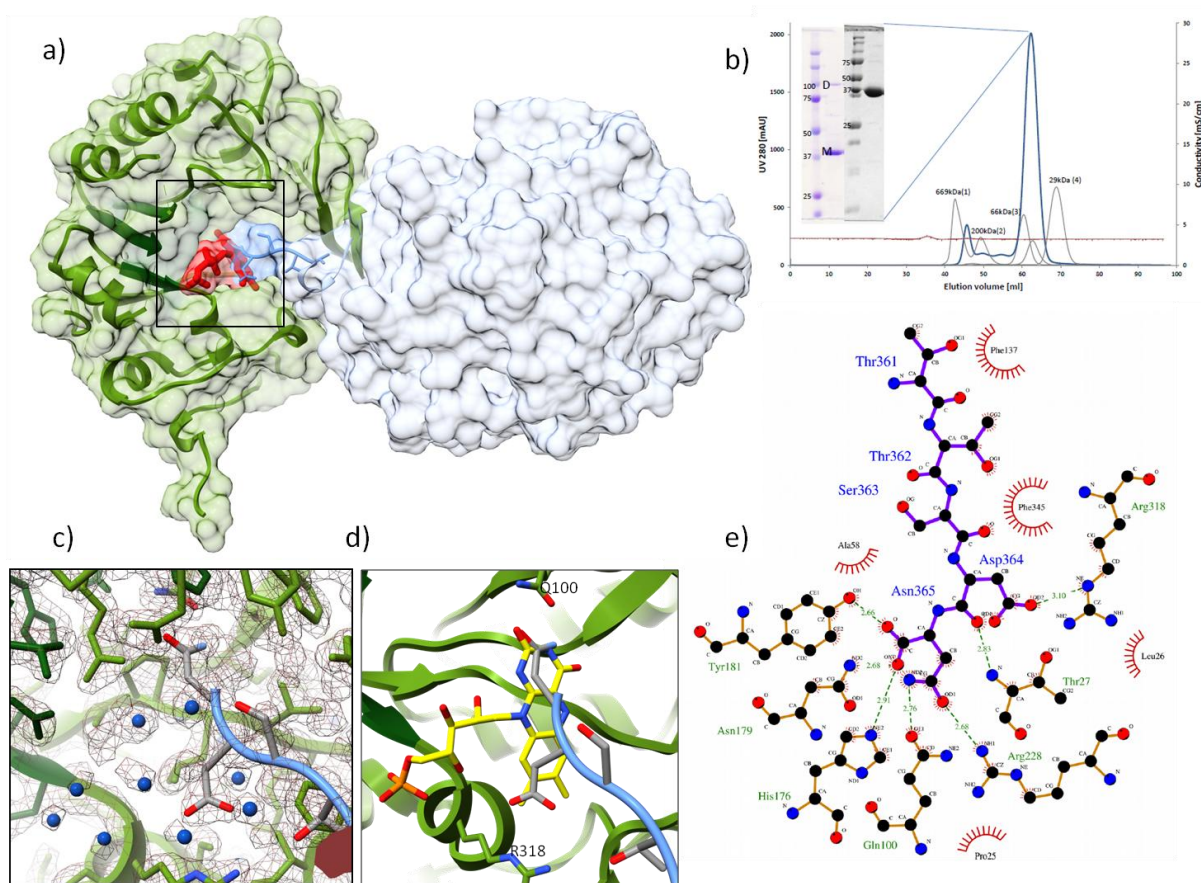


Figure 2. Structure of the XdpB “pseudo-dimer” formed upon intermolecular interactions of C-terminal pentapeptide with FMN binding region. a) Ribbon and surface representation of the XdpB “pseudo-dimer”. The C-terminal pentapeptide TTSDN (in blue) mimics the binding of FMN (in red, added from NerA structure containing FMN by overlapping over the XdpB structure). b) gel filtration chromatography of XdpB (in blue), conductivity (in red), size standards (in gray): Thyroglobulin, bovine, 669kDa (1); β -amylase, 200kDa(2); Albumin, bovine, 66kDa(3); Carbonic Anhydrase, bovine, 29kDa (4); SDS-PAGE analysis: non reducing conditions (in color; M corresponds to monomer and D for dimer) and reducing conditions (in grey). c) Network of 8 hydrogen-bonded water molecules in the FMN binding site of XdpB. d) The putative FMN isoalloxazine ring is mimicked by D364 and N365. e) Interaction scheme of C terminal pentapeptide produced by LigPlot+ [23].

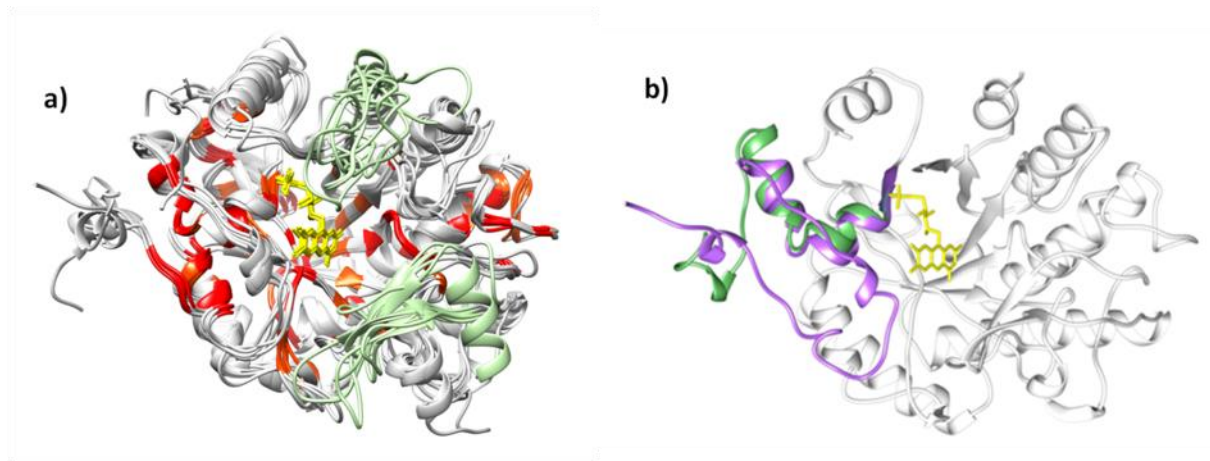


Figure 3. Comparison of subgroups OYE C1 and OYE C2. a) Structural alignment of OYE C1 subgroup members: 5epd (This work) 1bwk [30], 4qnw[31], 2gou [32], 4a3u [33], 3aty [34], 1h51[35], 4jic [12], 2hsa without loop Q281-T315 [36]. The conserved residues are depicted by red. Highly variable regions are in green. Highly conserved FMN binding site is evident from FMN overlap. b) Comparison of characteristic features with OYE C2 subgroup. OYE C1 subgroup characteristic C-terminal loop is depicted in magenta. This loop bears conserved motif GxxDYP and is missing in OYE C2 subgroup. The OYE C2 terminal loop is depicted by forest green.

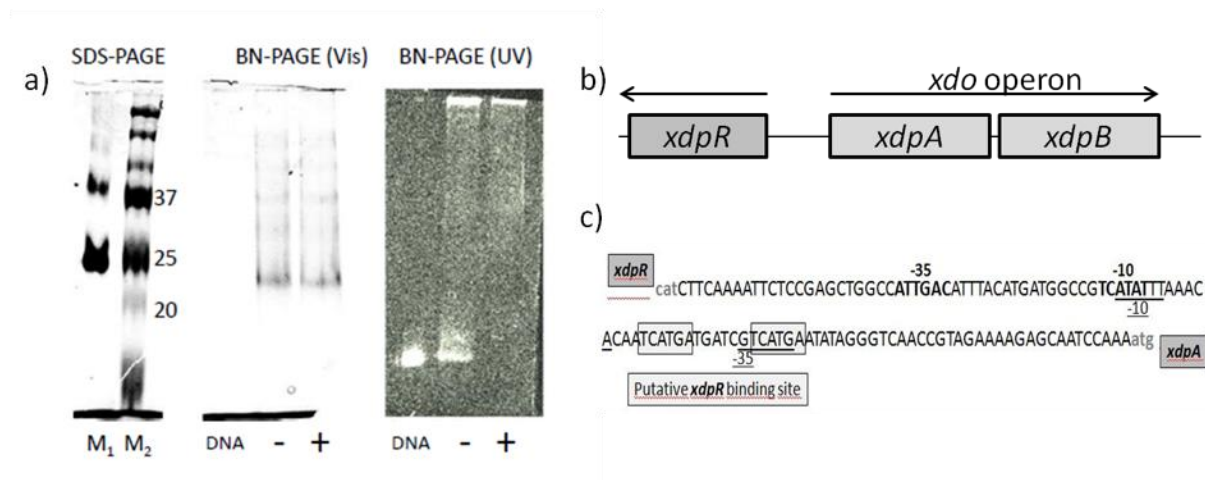


Figure 4. Gel-shift assay and the transcriptional control of xdo operon. a) SDS-PAGE analysis of protein XdpR (M1) which is present mainly as a monomer (19kDa including N terminal His tag, the mobility differs from expected value) and dimer (38kDa), M2 - Protein Standards marker, and Blue native electrophoresis (BN-PAGE) of XdpR-DNA binding. Lane DNA – pure DNA; lane+ - binding DNA (26 nt) and XdpR; lane- - negative control. b) xdo operon, *xdpR* gene and orientation of genes. c) Bioinformatics analysis of the regulatory region.

References

1. Amato, E.D. and J.D. Stewart, *Applications of protein engineering to members of the old yellow enzyme family*. Biotechnology Advances, 2015. **33**(5): p. 624-631.
2. Kanekar, P.P., S.S. Sarnaik, P.S. Dautpure, V.P. Patil, and S.P. Kanekar, *Bioremediation of Nitroexplosive Waste Waters*, in *Biological Remediation of Explosive Residues*, N.S. Singh, Editor. 2014, Springer International Publishing: Cham. p. 67-86.
3. Schaller, F., C. Biesgen, C. Müssig, T. Altmann, and W.E. Weiler, *12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis*. Planta. **210**(6): p. 979-984.
4. Fitzpatrick, T.B., N. Amrhein, and P. Macheroux, *Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme Homolog from Bacillus subtilis Involved in the Oxidative Stress Response*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(22): p. 19891-19897.
5. Odat, O., S. Matta, H. Khalil, S.C. Kampranis, R. Pfau, P.N. Tschlis, and A.M. Makris, *Old Yellow Enzymes, Highly Homologous FMN Oxidoreductases with Modulating Roles in Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(49): p. 36010-36023.
6. Kubata, B.K., Z. Kabututu, T. Nozaki, C.J. Munday, S. Fukuzumi, K. Ohkubo, M. Lazarus, T. Maruyama, S.K. Martin, M. Duszenko, and Y. Urade, *A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by Trypanosoma cruzi*. The Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(9): p. 1241-1252.
7. Miura, K., Y. Tomioka, H. Suzuki, M. Yonezawa, T. Hishinuma, and M. Mizugaki, *MOLECULAR CLONING OF THE nemA GENE ENCODING N-ETHYLMALIMIDE REDUCTASE FROM Escherichia coli*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1997. **20**(1): p. 110-112.
8. Nizam, S., S. Verma, N.N. Borah, R.K. Gazara, and P.K. Verma, *Comprehensive genome-wide analysis reveals different classes of enigmatic old yellow enzyme in fungi*. Scientific Reports, 2014. **4**: p. 4013.
9. French, C.E. and N.C. Bruce, *Purification and characterization of morphinone reductase from Pseudomonas putida M10*. Biochemical Journal, 1994. **301**(1): p. 97-103.
10. Kyslíková, E., P. Babiak, V. Štěpánek, J. Zahradník, A. Palyzová, H. Marešová, R. Valešová, J. Hájíček, and P. Kyslík, *Biotransformation of codeine to 14-OH-codeine derivatives by Rhizobium radiobacter R89-1*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **87**: p. 1-5.
11. Zahradník, J., E. Kyslíková, and P. Kyslík, *Draft Genome Sequence of Agrobacterium sp. Strain R89-1, a Morphine Alkaloid-Biotransforming Bacterium*. Genome Announcements, 2016. **4**(2).
12. Oberdorfer, G., A. Binter, S. Wallner, K. Durchschein, M. Hall, K. Faber, P. Macheroux, and K. Gruber, *The Structure of Glycerol Trinitrate Reductase NerA from Agrobacterium radiobacter Reveals the Molecular Reason for Nitro- and Ene-Reductase Activity in OYE Homologues*. Chembiochem, 2013. **14**(7): p. 836-845.
13. Kabsch, W., *XDS*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. **66**(Pt 2): p. 125-132.
14. Winn, M.D., C.C. Ballard, K.D. Cowtan, E.J. Dodson, P. Emsley, P.R. Evans, R.M. Keegan, E.B. Krissinel, A.G.W. Leslie, A. McCoy, S.J. McNicholas, G.N. Murshudov, N.S. Pannu, E.A. Potterton, H.R. Powell, R.J. Read, A. Vagin, and K.S. Wilson, *Overview of the CCP4 suite and current developments*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2011. **67**(Pt 4): p. 235-242.

15. Long, F., A.A. Vagin, P. Young, and G.N. Murshudov, *BALBES: a molecular-replacement pipeline*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2008. **64**(Pt 1): p. 125-132.
16. Murshudov, G.N., P. Skubák, A.A. Lebedev, N.S. Pannu, R.A. Steiner, R.A. Nicholls, M.D. Winn, F. Long, and A.A. Vagin, *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2011. **67**(Pt 4): p. 355-367.
17. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
18. Chen, V.B., W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, and D.C. Richardson, *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. **66**(Pt 1): p. 12-21.
19. Schagger, H. and G. von Jagow, *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Analytical Biochemistry, 1991. **199**(2): p. 223-231.
20. Okonechnikov, K., O. Golosova, M. Fursov, and t.U. team, *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*. Bioinformatics, 2012. **28**(8): p. 1166-1167.
21. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*. Molecular Biology and Evolution, 2013. **30**(12): p. 2725-2729.
22. Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin, *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
23. Laskowski, R.A. and M.B. Swindells, *LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2011. **51**(10): p. 2778-2786.
24. Johnson, M., I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, and T.L. Madden, *NCBI BLAST: a better web interface*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**(Web Server issue): p. W5-W9.
25. Solovyev, V., Salamov, A., *Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Nova Science Publishers, 2011: p. 61-78.
26. Deng, W., C. Li, and J. Xie, *The underlying mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors*. Cellular Signalling, 2013. **25**(7): p. 1608-1613.
27. MacLellan, S.R., A.M. MacLean, and T.M. Finan, *Promoter prediction in the rhizobia*. Microbiology, 2006. **152**(6): p. 1751-1763.
28. Marshall, S.J., D. Krause, D.K. Blencowe, and G.F. White, *Characterization of Glycerol Trinitrate Reductase (NerA) and the Catalytic Role of Active-Site Residues*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(6): p. 1802-1810.
29. Schneider, B., J.-C. Gelly, A.G. de Brevern, and J. Černý, *Local dynamics of proteins and DNA evaluated from crystallographic B factors*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2014. **70**(Pt 9): p. 2413-2419.
30. Brown, B.J., Z. Deng, P.A. Karplus, and V. Massey, *On the Active Site of Old Yellow Enzyme: ROLE OF HISTIDINE 191 AND ASPARAGINE 194*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(49): p. 32753-32762.
31. Chilton, A.S., A.L. Ellis, and A.L. Lamb, *Structure of an Aspergillus fumigatus old yellow enzyme (EasA) involved in ergot alkaloid biosynthesis*. Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications, 2014. **70**(Pt 10): p. 1328-1332.

32. van den Hemel, D., A. Brigé, S.N. Savvides, and J. Van Beeumen, *Ligand-induced Conformational Changes in the Capping Subdomain of a Bacterial Old Yellow Enzyme Homologue and Conserved Sequence Fingerprints Provide New Insights into Substrate Binding*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(38): p. 28152-28161.
33. Reich, S., H.W. Hoeffken, B. Rosche, B.M. Nestl, and B. Hauer, *Crystal Structure Determination and Mutagenesis Analysis of the Ene Reductase NCR*. ChemBioChem, 2012. **13**(16): p. 2400-2407.
34. Okamoto, N., K. Yamaguchi, E. Mizohata, K. Tokuoka, N. Uchiyama, S. Sugiyama, H. Matsumura, K. Inaka, Y. Urade, and T. Inoue, *Structural insight into the stereoselective production of PGF2 α by Old Yellow Enzyme from Trypanosoma cruzi*. Journal of Biochemistry, 2011. **150**(5): p. 563-568.
35. Barna, T.M., H. Khan, N.C. Bruce, I. Barsukov, N.S. Scrutton, and P.C.E. Moody, *Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: "flipped" binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme*. Journal of Molecular Biology, 2001. **310**(2): p. 433-447.
36. Breithaupt, C., R. Kurzbauer, H. Lilie, A. Schaller, J. Strassner, R. Huber, P. Macheroux, and T. Clausen, *Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: Self-inhibition by dimerization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(39): p. 14337-14342.
37. Adalbjörnsson, B.V., H.S. Toogood, A. Fryszkowska, C.R. Pudney, T.A. Jowitt, D. Leys, and N.S. Scrutton, *Biocatalysis with Thermostable Enzymes: Structure and Properties of a Thermophilic 'ene'-Reductase related to Old Yellow Enzyme*. ChemBioChem, 2010. **11**(2): p. 197-207.
38. Spiegelhauer, O., S. Mende, F. Dickert, S.H. Knauer, G.M. Ullmann, and H. Dobbek, *Cysteine as a Modulator Residue in the Active Site of Xenobiotic Reductase A: A Structural, Thermodynamic and Kinetic Study*. Journal of Molecular Biology, 2010. **398**(1): p. 66-82.
39. Schittmayer, M., A. Glieder, M.K. Uhl, A. Winkler, S. Zach, J.H. Schrittwieser, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Gruber, S. Kambourakis, J.D. Rozzell, and M. Winkler, *Old Yellow Enzyme-Catalyzed Dehydrogenation of Saturated Ketones*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2011. **353**(2-3): p. 268-274.
40. Ehira, S., H. Teramoto, M. Inui, and H. Yukawa, *A novel redox-sensing transcriptional regulator CyeR controls expression of an Old Yellow Enzyme family protein in Corynebacterium glutamicum*. Microbiology, 2010. **156**(5): p. 1335-1341.
41. Alexandre, H., V. Ansanay-Galeote, S. Dequin, and B. Blondin, *Global gene expression during short-term ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 2001. **498**(1): p. 98-103.
42. Koerkamp, M.G., M. Rep, H.J. Bussemaker, G.P. Hardy, A. Mul, K. Piekarska, C.A. Szigartyo, J.M. De Mattos, and H.F. Tabak, *Dissection of transient oxidative stress response in Saccharomyces cerevisiae by using DNA microarrays*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2783-94.
43. Umezawa, Y., T. Shimada, A. Kori, K. Yamada, and A. Ishihama, *The Uncharacterized Transcription Factor YdhM Is the Regulator of the nemA Gene, Encoding N-Ethylmaleimide Reductase*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(17): p. 5890-5897.
44. Brige, A., D. Van den Hemel, W. Carpentier, L. De Smet, and J.J. Van Beeumen, *Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from Shewanella oneidensis indicate differences in physiological function*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 1): p. 335-44.

45. Spiegelhauer, O., T. Werther, S. Mende, S.H. Knauer, and H. Dobbek, *Determinants of substrate binding and protonation in the flavoenzyme xenobiotic reductase A*. J Mol Biol, 2010. **403**(2): p. 286-98.
46. Williams, R.E., D.A. Rathbone, N.S. Scrutton, and N.C. Bruce, *Biotransformation of Explosives by the Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(6): p. 3566-3574.
47. Blehert, D.S., K.L. Knoke, B.G. Fox, and G.H. Chambliss, *Regioselectivity of nitroglycerin denitration by flavoprotein nitroester reductases purified from two Pseudomonas species*. Journal of Bacteriology, 1997. **179**(22): p. 6912-6920.
48. Snape, J.R., N.A. Walkley, A.P. Morby, S. Nicklin, and G.F. White, *Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from Agrobacterium radiobacter*. Journal of Bacteriology, 1997. **179**(24): p. 7796-7802.
49. Willey, D.L., D.A. Caswell, C.R. Lowe, and N.C. Bruce, *Nucleotide sequence and over-expression of morphine dehydrogenase, a plasmid-encoded gene from Pseudomonas putida M10*. Biochemical Journal, 1993. **290**(Pt 2): p. 539-544.
50. Niino, Y.S., S. Chakraborty, B.J. Brown, and V. Massey, *A New Old Yellow Enzyme of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(5): p. 1983-1991.
51. Reinhard, L., H. Mayerhofer, A. Geerlof, J. Mueller-Dieckmann, and M.S. Weiss, *Optimization of protein buffer cocktails using ThermoFluor*. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2013. **69**(Pt 2): p. 209-214.
52. Forneris, F., R. Orru, D. Bonivento, L.R. Chiarelli, and A. Mattevi, *ThermoFAD, a ThermoFluor®-adapted flavin ad hoc detection system for protein folding and ligand binding*. FEBS Journal, 2009. **276**(10): p. 2833-2840.

Supplementary material

Thermofluor assay. The method was used to optimize a buffer pH and ionic strength by means of T_m determination using CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad[51] (19). The XdpB solution (1.2 mg.ml^{-1}) was applied to Flat Cap strips (Bio-Rad) as follows: $6.25 \text{ }\mu\text{l}$ and $3.13 \text{ }\mu\text{l}$ of the solution was mixed with $17.75 \text{ }\mu\text{l}$ and $20.87 \text{ }\mu\text{l}$ of buffer, respectively. The SYPRO® Orange dye (Sigma) was used as fluorescent label ($1 \text{ }\mu\text{l}$ of 25times diluted stock solution into each reaction mixture). The mixtures were preincubated for 30 min at 0°C and the reaction temperature was step-wise increased by 0.5°C in the range from 4 to 80°C . Fluorescence of mixtures was assayed after 30 s incubation at each temperature in FRET mode and the results were evaluated (Bio-Rad CFX Manager 3.0). Parallel assays were performed using a method ThermoFAD(FMN) with samples prepared analogously [52].

Intact protein MALDI MS. According to instrument manual : solution of protein were mixed with Sinapic acid solution 5 mg/ml in 50% Acetonitrile, 0,1% TFA in ratio 1 to 10. This mixture were spotted on MALDI plate and measured in linear MALDI ToF mode on a 4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzer (AB Sciex). Proteins mass were read directly from spectrum.

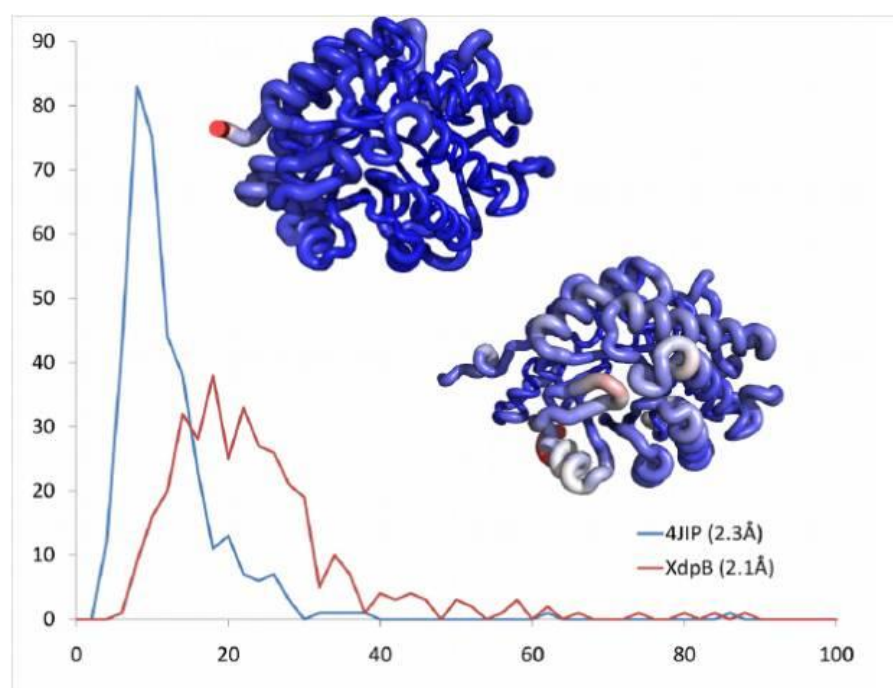


Figure S1. Comparison of scaled B-factor for NerA (4JIP) in blue upper molecule and XdpB (5epd) in red. The color and thickness of the representation show scaled B-factor per residue ranging from low values (blue) to high (red) [29].

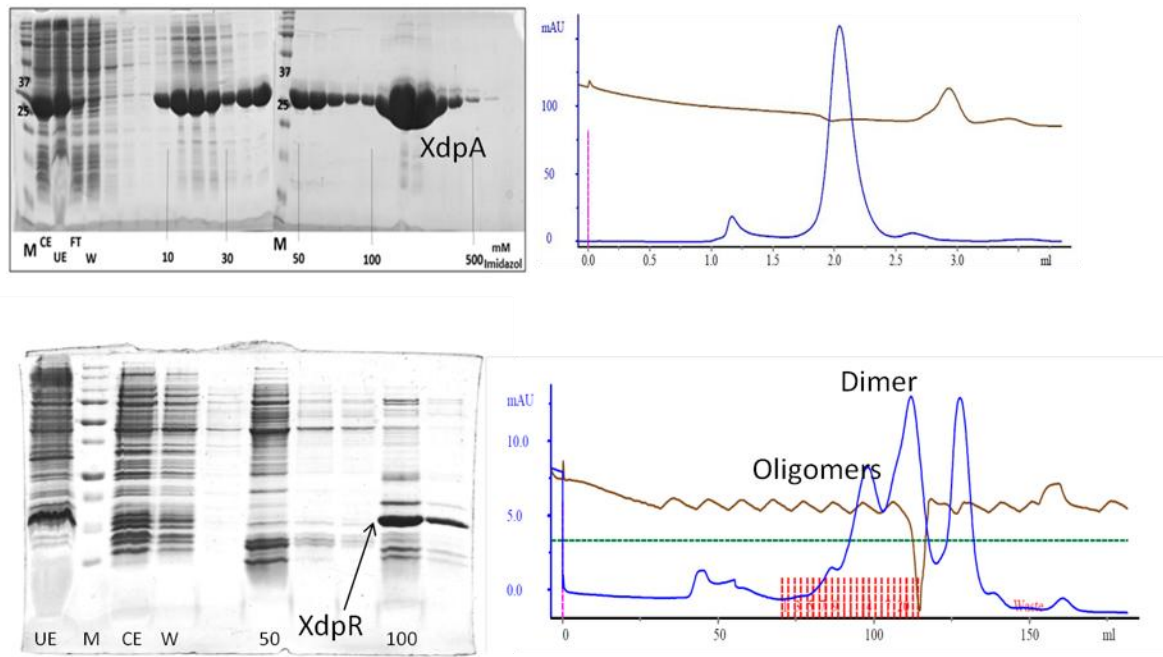
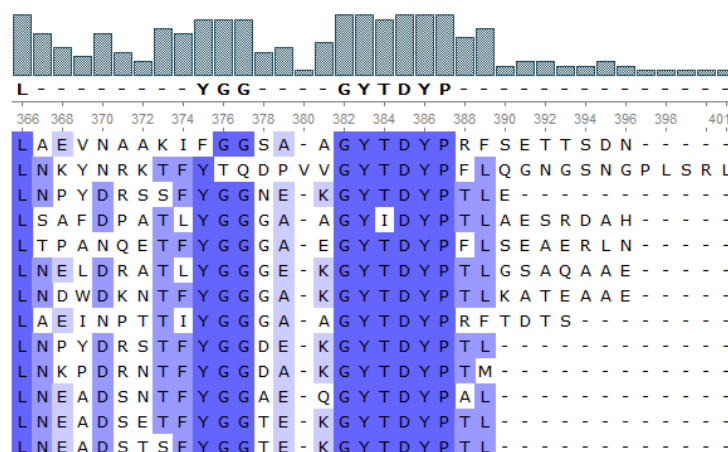
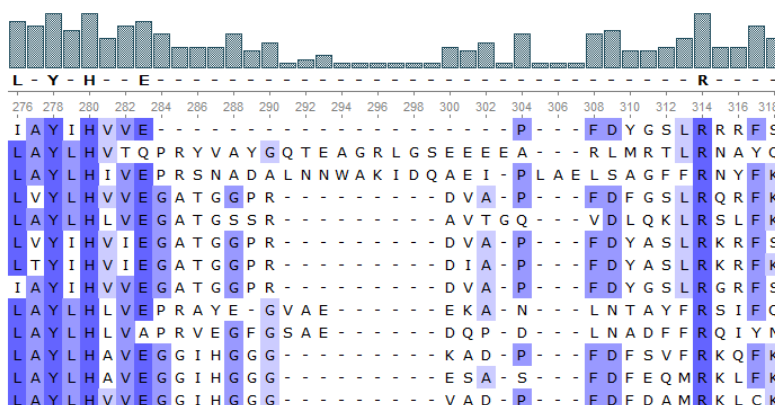


Figure S2. Purification of XdpA and XdpR. a) Electrophoreogram from XdpA NiNTA purification. M-molecular marker (same as in text), CE – cytosolic extract, UE – insoluble (urea) extract, FT-non bound fraction, W-wash fractions, numbers refers to imidasole step elution. b) Superdex 75 5/150 showing the identified dimer. Absorbance 280 nm in blue; conductivity in brown; c) Electrophoreogram from XdpR NiNTA purification. Lanes same as above. d) Superdex 200 16/600 chromatography shoving the monomer, dimer and oligomers of XdpR.

XdpB
OPR3
A0A073CFT5
A0A077LI68
A0A0D2TBF3
A4YPG4
A0A0D7NR28
A0A067U0T2
D8G840
L8N043
Y0KIB7
UPI000646292
A0A0B7IV26



XdpB
OPR3
A0A073CFT5
A0A077LI68
A0A0D2TBF3
A4YPG4
A0A0D7NR28
A0A067U0T2
D8G840
L8N043
YOKIB7
UPI000646292
A0A0B7IV26



XXX

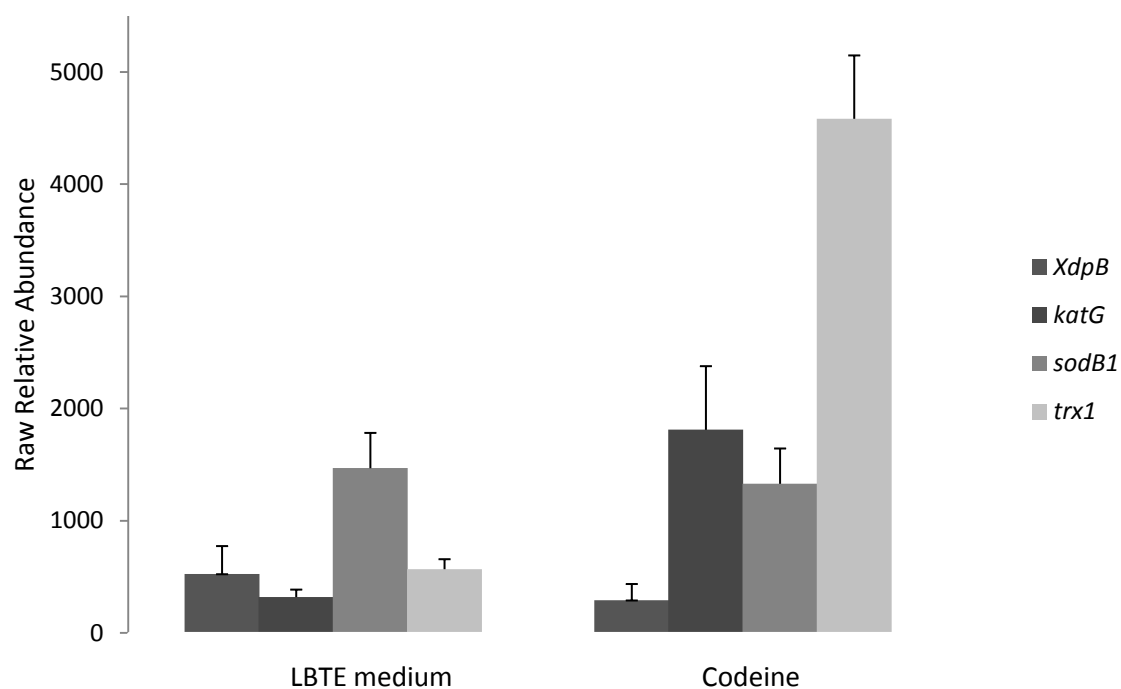


Figure S4. Relative quantification of gene expression by RT qPCR. Comparison of *XdpB* and selected oxidative stress markers of strain R89-1 grown on LBTE medium and on LBTE supplemented with 1g/L codeine. The sample grown in LB medium (13.5 h) was used as a reference and the *coxA* gene served as an endogeneous control. All experiments were done in independent triplicates.

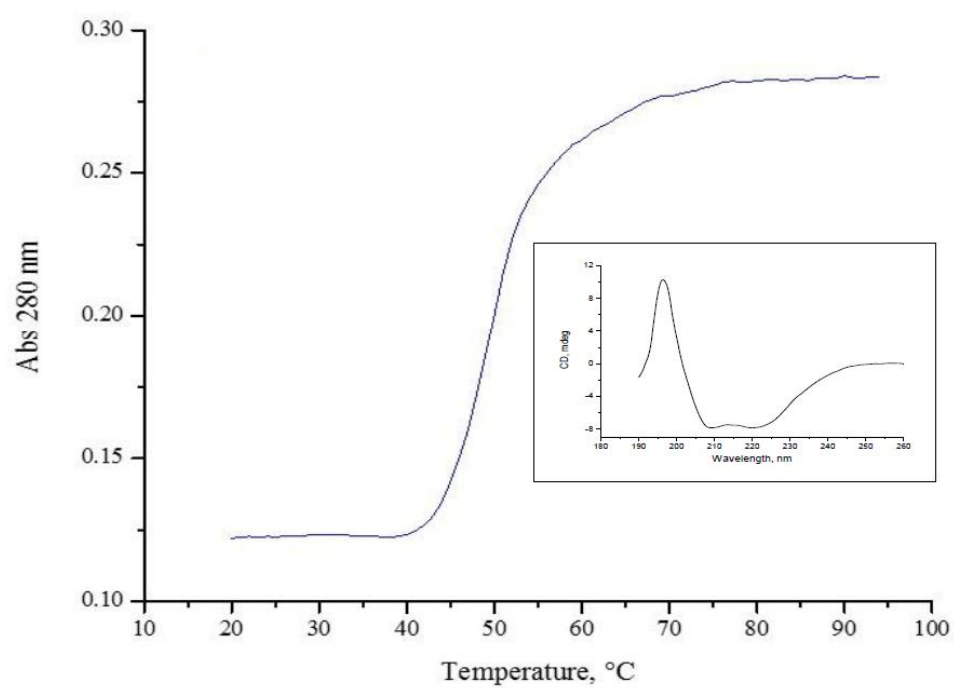


Figure S5. UV melting and the CD spectra for XdpBA5 NHis variant.

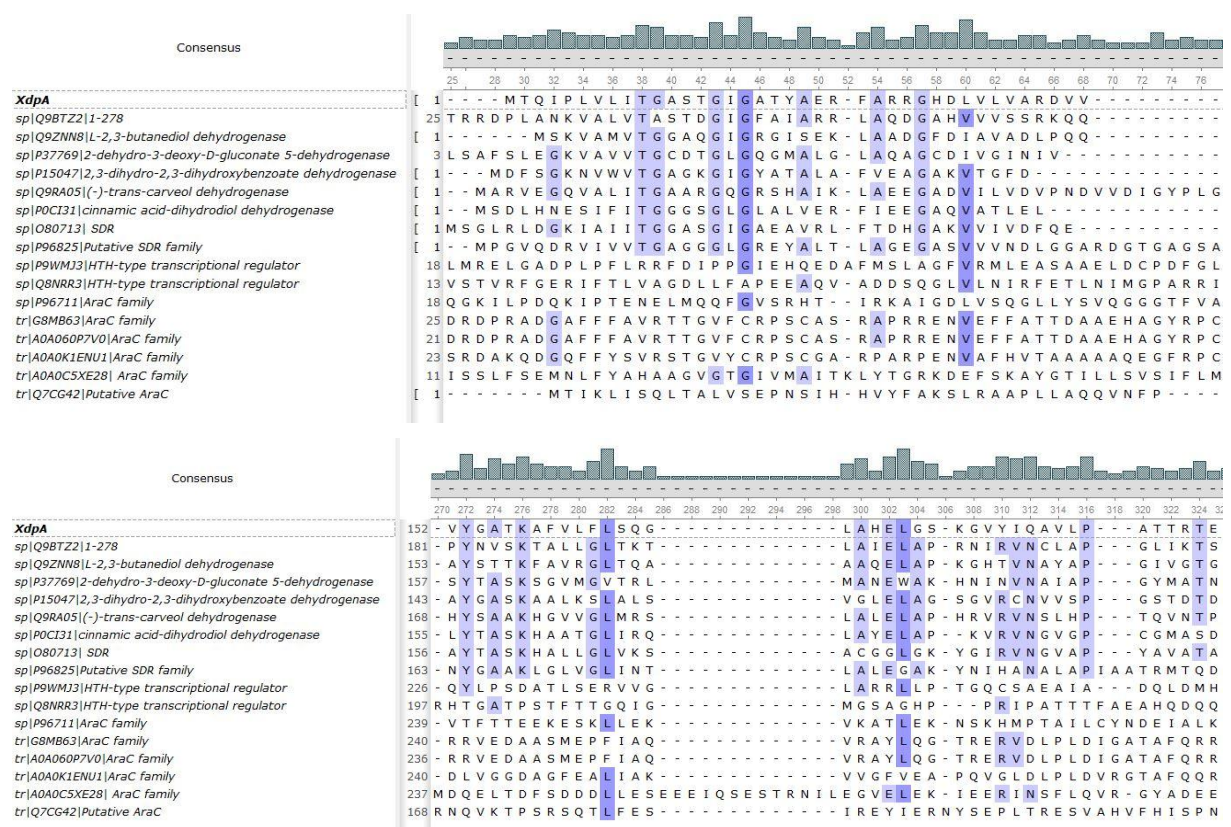


Figure S6. Alignment for XdpA and SDH family members (upper panel) and XdpA vs AraC regulators (lower panel).

Příloha P3 – Přípravná verze publikace charakterizující degradační potenciál mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 (v anglickém jazyce)

Tato příloha detailně popisuje izolaci a vlastnosti mikroorganismu *Raoultella* sp. KDF8 použitého v této práci. Kromě kodeinu je mikroorganismus *Raoultella* schopný degradace dalšího důležitého farmaceutického mikropolutantu – diklofenaku.

Z důvodu zřetelného odlišení této přílohy od ostatních částí diplomové práce není dodrženo doporučené formátování a je využito odlišné typografické úpravy textu.

Microbial removal of the pharmaceutical compounds Diclofenac and Codeine by *Raoultella* sp. KDF8

Authors

Andrea Palyzová (1)*, Jiří Zahradník (1)(2)(3) *, Helena Marešová (1), Lucie Sokolová (4), Eva Kyslíková (1), V. Štěpánek (1), M. Grulich (1) and Pavel Kyslík (1)

Affiliations

(1) Laboratory of Enzyme Technology, Institute of Microbiology CAS, v. v. i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

(2) Laboratory of Biomolecular Recognition, Institute of Biotechnology, v.v.i., BIOCEV, Průmyslová, CZ-252 20 Prague region, Czech Republic

(3) Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University Prague, Viničná 5, CZ-128 44 Prague 2, Czech Republic

(4) Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology CAS, v. v. i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

Abstract

A bacterium was isolated from the sample of composted wastes of *Papaver somniferum* and soils polluted with chemical waste that has the ability to use diclofenac (DCF) or codeine (CD) as its sole carbon and energy source. Based on 16S rRNA gene phylogeny, biochemical and morphological properties, the strain was designated as *Raoultella* sp. KDF8. The bacterium is able to remove DCF or CD from medium and transform it into metabolites. After cultivation of strain in optimized conditions (28°C, pH 7.0, drug concentration 1 g L⁻¹) HPLC analysis of separated culture supernatant and biomass yield consistent residue's concentration of DCF only in biomass yield (8%). When used as a whole-cell catalyst, 92 – 63 % degradation was achieved at concentration of DCF up to 5.0 g/l and 45 - 27 % transformation at concentration of CD up to 1.0 g/l to metabolites as single products. The presence of five predominant metabolites of CD degradation and one metabolite of DCF degradation in culture supernatant suggests that this soil bacterial strain *Raoultella* sp. KDF8 would be potential degrader of both pharmaceuticals and may have environmental relevance.

Introduction

The release of emerging pollutants such as pharmaceutical compounds and their metabolites into the aquatic environment has become an issue of increasing concern over recent years. The elimination of these emerging pollutants from discharges is desirable because of potential damages to environmental organisms even at low concentrations (Gavrilescu et al., 2015). Conventional wastewater treatment system such as filtration and activated sludge do not efficiently remove active pharmaceutical ingredients (API) and as a result they have been found in environmental samples including surface water, groundwater and drinking water (Behera et al., 2011; Benotti et al., 2009). Similarly, physicochemical techniques for the removal of APIs are based upon ozonation and oxidation processes (Ikehata et al., 2006) have their specific disadvantages, such as the formation of toxic products (Guzzella et al., 2002; Richardson et al., 2007). In principle, biological techniques can be more robust and effective for removal of pharmaceutical pollutants compared to the other technologies.

Studies on the occurrence of pharmaceuticals show that the widely used analgesics (e.g. diclofenac and codeine) are present in relevant concentrations in the environment (Schwarzenbach et al., 2006; Birch et al., 2015). Diclofenac (2-(2-(2,6-dichlorophenylamino) phenyl) acetic acid; DCF) is non-steroidal drug, used against pain, fever and inflammation which is extensively used in human medical care. Codeine (CD) is nature alkaloids produced by *Papaver somniferum* and *Papaver bracteatum* and displays analgesic, antitussive and narcotic antagonist characteristics. Bacterial degradation of drugs have been reported with white rot fungi, capable of producing extracellular lignin peroxidase (Zhang et al., 2010), laccase (Marco-Urrea et al., 2010), manganese peroxidase (Rodarte-Morales et al., 2012) lead to a significant biodegradation rate of DCF. Moreover, the removing of DCF was described during manganese oxidation by *Pseudomonas putida* MnB6 when the degradation was improved by the presence of manganese-oxidizing bacterial biomass (Meerburg et al., 2012). With regards to codeine, the bacterial transformations were described with filamentous fungi of the genres *Trametes* (Iizuka et al., 1962; Yamada et al., 1963; Asai et al., 1964; Aida et al., 1964), Cunninghamella (Gibson et al., 1984) and the strain *Mucor piriformis* (Madyastha et al., 1994). Additional, bacterial transformations of the morphine alkaloids have also been reported with the strains *Arthrobacter* sp. (Liras et al., 1975), *Pseudomonas testosterone* (Liras et al., 1975), *Pseudomonas putida* M10 (Walker et al., 2000), *Bacillus* sp. (Madyastha et al., 1994), *Mycobacterium neoaurum* MTP650 (Zhang et al., 2005) and *Streptomyces griseus* NRRL B8090 (Harder et al., 1989) and *Rhizobium radiobacter* R89-1 (Kyslikova et al., 2012).

So far, little is known about bacteria that utilized analgesic and involved biodegradation pathways. Only a few bacterial strains (for example *Shingomonas* sp. strain Ibu-2 or *Pseudomonas putida* F1) have been described that use these drugs as carbon and energy source (Murdoch et al., 2005). The objectives of this study were (1) isolation of a new soil isolate *Raoultella* sp. KDF8 capable of utilization diclofenac or codeine as a sole carbon and energy source by growing cell, (2) to investigate the intermediates should be identified during growth exponential phase and (3) optimization of conditions for degradation of **DCF** (at concentration up to 6g/l) and **CD** (at concentration up to 1g/l) by whole cell catalyst. This allows us to get insight into the biodegradation process, including enrichment of the

responsible bacteria, elucidation the potential degradation pathways and evaluation of the removal of these pharmaceuticals from an environment.

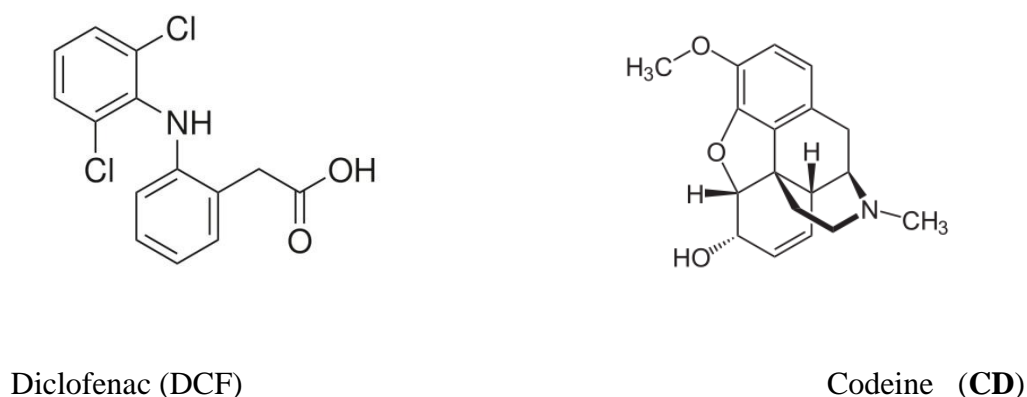


Figure 1: Chemical structure of diclofenac (DCF) and codeine (CD).

Materials and Methods

Microorganisms and chemicals

Microorganisms for screening were obtained from environmental samples. These have been collected from soils polluted with chemical waste (sewage disposal plant, central Bohemia) and factory producing poppy seeds (Agrobyskovice s.r.o., Neratovice, CR; 50°25'85.65''N, 14°48'53.81''E). Microorganisms were maintained as frozen glycerol stock cultures at -70°C. The media components were sourced from Hi Media Laboratory (Mumbai, India), Oxoid (UK) and Difco (USA). Codeine (CD), Diclofenac (DCF), 4-hydroxydiclofenac (4OHDF) and 2,6-dichloroanilin (DCA) were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, USA). Stock solutions of **DCF** and **CD** (100 mg/ml) were prepared by dissolving DCF in ethylalcohol, and CD in dimethyl sulfoxide (DMSO), and sterilized on 0.2 µm nylon membrane filters (Whatman). HPLC grade solvents were used in HPLC systems and obtained from Millinckrodt Baker, USA. Organic solvents were obtained from Merck (Germany).

Culture conditions and screening procedures

The cultures of bacteria were grown in LB medium (1% tryptone, 0.5 % yeast extract, 1.0% sodium chloride, pH 7.0 adjusted before sterilization). Basal salts broth medium (BSBTE) used in the study contained in 1% sodium chloride, 10% potassium hydrogen phosphate, 7.5% potassium dihydrogen phosphate, 10% ammonium chloride, pH 6.7 adjusted before sterilization, supplemented with trace elements: MgSO₄ · 7H₂O 200 mg/L, CaCl₂ · 2H₂O 50 mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O 60 mg/L, MnSO₄ · 4H₂O 17 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 15 mg/L, CoCl₂ · 6H₂O 50 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O 50 mg/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 50 mg/L. To prepare solid media for screening or a short-term strain maintenance, 22 g/L agar were added to the media LB or BSBTE.

Standard cultures were grown in 100 ml of a given medium (500 – mL culture flask) on an orbital shaker (200 rpm) at 30°C. For screening, the single-colony isolates were grown in 20 mL of BSBTE medium with concentration of **DCF** and **CD** (1 g/L) that were added into the medium at the beginning of the culture.

Small-scale cultures of whole-cell catalyst (3 mL) in 6-well cell culture plates (mcp) were grown on an orbital shaker (200 rpm) at 30°C for 72h. Three replicate cultures were established.

The soil samples were collected from different depth of wasted places of disposal site of sewage disposal plant (10 cm and 30 cm underground) and *P. somniferum* composted for 3 years. Each soil sample was homogenized and the amount of about 5 g was suspended in 100 mL of LB. The mixture was shaken at 28 °C for 24 h, diluted by mineral medium BSBTE supplemented with **DCF** or **CD** (at a concentration of 1 g/L) in a 1: 3 ratio and shaken for another 48 hours (200 rpm and 28 °C). The dilution step was repeated and the resulting autochthonous culture was plated on solid LB and BSB media containing the **DCF** or **CD** at concentration of 1 g/L. After 2- 3 days of growth at 28°C, single-colony isolates (SCI) with different morphologies (400 strains) were analysed for their capability of degradation of **DCF** or **CD**: 20 mL of the BSBTE liquid medium in sterile 100-mL flasks supplemented with **DCF** or **CD** (1g/L) was inoculated with individual isolates and incubated on the shaker for 72h (28°C, 200 rpm). After cultivation, the culture deprecating **DCF** or **CD** were further analysed by HPLC to determine degree of residual concentration of both compounds. Selected isolates capable of utilization **DCF** or **CD** were maintained as frozen glycerol stock cultures at -80°C.

Identification of isolated microorganism

Bacterial strain identification was based on classical phenotypic and biochemical analysis (CCM, Masaryk University, Brno, Czech Republic) and molecular taxonomy analysis of the 16S rDNA gene (our laboratory). The culture grew in LB medium at 28°C for 16h. The chromosomal DNA was isolated and purified using the commercially available High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. The chromosomal locus of 16S rDNA coding region was amplified by standard polymerase chain reaction (PCR). All PCR experiments were carried out in 0.5 mL thin walled PCR tubes using a PTC-200 thermal cycler (MJ Research). PCR reaction were performed using proofreading Herculanase[®] II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) and universal conserved primer pair Fwd27 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) and Rev1492 (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) in 25 µL volumes. PCR conditions were as follows: 2 min at 98°C; 40 cycles of 20 s at 98°C, 20 s at 55°C, and 60 s at 72°C; 10 min at 72°C. PCR amplicons were purified using High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Switzerland) following the manufacture's protocol.

The determination of nucleotide sequences was carried out at the Institute of Microbiology of the AS CR, v.v.i. by the dideoxy chain-terminating method using universal 16S rDNA primers [Fwd27; Rev1492; internal Fwd519 (CAGCMGCCGCGGTAATAC)] and automated DNA sequencer ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). The obtained sequences were edited by Chromas Lite software (Technelysium Pty Ltd., Australia), assembled and further analyzed by the Lasergene software program pack (DNASTAR, Inc.,

U.S.A.). Searching of 16S rDNA sequence similarity was performed at GenBank data library using the BLASTN program (National Center for Biotechnology Information, U.S.A.).

Monitoring diclofenac and codeine via HPLC

Quantitative determination of residual concentration of CD or DCF was done by HPLC (Dionex with PDA detector) on a column Lichroprep RPC18 250 mm x 4.6 mm (Waters). Extraction of compounds and preparation of samples for HPLC analyses: 1 mL of the culture liquid was extracted with 1 mL terc-butyl methyl ether (TBME) under vigorous shaking (vortex mixer) for 20 min. Organic and water phases were separated by centrifugation (12 000g, 10 min) and degradation of a substrates were determined in the organic phase. Mobil phases for CD and DCF were water and methanol (4:1 V/V + 0,1% TFA for CD; 3:7 V/V + 0.2% phosphoric acid for DCF), and the flow rate was 1.0 mL/min resp. 0.8 mL/min. The samples volume was 10 μ L, column was maintained at the temperature of 40°C resp. 28°C. Detection of CD was done at 220 and 214 nm and DCF at 215 and 275 nm. The retention times of compounds were: **DCF** 11,2 min, **CD** 4.7 min. Extraction equilibrium was experimentally verified and calibration curves for HPLC assay was empirically determined. Pharmaceuticals were found completely dissolved in the extraction reagents with stable equilibrium at given temperature. Nonlinear concentration dependence was observed for diclofenac due to a limited solubility in ether system and therefore, experimentally determined polynomial equation was used for calculation.

Effects of concentration substrates 1 and 2 on growth parameters

The strain *Raoultella* sp. KDF8 CCM 8678 was grown in liquid BSBTE medium containing CD or DCF in concentration ranging from 0.5 to 2.0 g/l. growth was monitored by measuring absorbance at 600 nm using a UV-Visible spectrophotometer from Shimadzu. The culture was sampled periodically and following parameters were determined: the amount of biomass CDW (cell dry weight), pH without maintenance and specific growth rate.

Optimization of process variables for DCF or CD degradation by whole-cell catalyst

Parameters such as pH, temperature (20, 28 and 37°C), concentration of biomass and concentration of substrates were optimized for maximum degradation of substrates **DCF** or **CD**. The biomass used in degradation experiments was harvested from stationary phase of growth in the medium LB. The biomass was washed with LB medium (pH optimum, temperature optimum) and frozen. Frozen biomass was stored at – 25°C for maximum of 3 months.

For experiments, the biomass was resuspended in the BSBTE medium to get the final concentration of 10% wet weight (WW). For small-scale cultures multiwall cell culture plates (mcp), 3-ml samples of the 10% WW biomass were transferred into 6-well mcp and CD or DCF were supplemented to get the final concentration 0.2 and 1.0 g/l of CD and (from 1.0 to 5 g/L of DCF). The experiments were performed in triplicate.

The effect of pH on the conversion was studied in the range of initial pH (pH^{INI}) from from 3 to 10 without pH maintenance. Conditions of biodegradation: temperature 28°C, 0.5g cells

(CWW) resuspended in the 5 mL BSBTE medium supplemented with **DCF** (1 g/l). After 48h of degradation, residual concentration of **DCF** and final pH of the culture (pH^F) were assayed.

Analysis of DCF and CD metabolites

In order to get a preliminary indication about the pathway of the **DCF** or **CD** degradation by *Raoultella* sp. KDF8 (CCM 8678), intermediates were analysed by xxxxxx with respect to various time periods of growth. For global metabolic profiling analysis: there was methanol/acetonitrile/acetone (1:1:1, v/v/v) added to samples (samples of culture, separated medium or biomass) and after that vigorously extracted for 15 min at room temperature (Bruce et al., 2009). The samples were then centrifuged at 12000g for 10 min at 4 °C. All the supernatant was removed and evaporated to dryness. The dry residue was reconstituted in The extract of compounds obtained on different times of exponential phase were dissolved in, and injected into a Bruker TOF MS System in a positive ionization mode. The m/z ratios

Results and discussion

Isolation, classification and characterization of bacterial degraders for drugs

We screened 400 bacterial strains from soil samples for degradation of drugs DCF and CD: there were 350 isolates capable of growth in a medium supplemented with DCF and 50 strains utilizing CD. Mixed population of these strains was cultured in LB medium and subjected to chemical mutagenesis by NMNG.

Only a single mutant exhibited degradation of these two drugs (both at concentration of 1g/l) and had the ability to use the DCF or CD as sources of carbone and energy for growth. The isolate was designated as the strain KDF8.

The physiological and biochemical characterization of the strain was performed at the Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno. The strain KDF8 is a Gram-negative bacterium, nonmotile, capsulated, requiring aerobic or facultatively anaerobic growth conditions. On nutrient TSA (Tryptic soya agar), colonies are circular, smooth and glossy. Positive results: catalase, glucose is fermented with the production of acid and gas, decarboxylation of lysine, production of indole, urease, Simmons citrate, acetoin, natrium-malonyl, hydrolysis of ONPG, acids from glucose, mannitol, inositol, adonitol, cellobiose, rhamnose, sucrose, sorbitol, trehalose, raffinose and melibiose, growth at 37°C, positive test with methyl red. Negative results: oxidase, production of hydrogen sulphide, decarboxylation of ornithine, arginine dihydrolase, deamination of phenylalanine, hydrolysis of Tween 80, gelatine and DNA, acids from dulcitol, nonmotile. The strain was classified as *Raoultella* sp. and deposited at the Czech Collection of Microorganisms under the number CCM8678. The molecular classification of the strain KDF8 was carried out by the 16S rDNA sequence analysis of an approximately 1.5 kb 16S rDNA amplicon obtained with the purified chromosomal DNA of this strain as a template. The BLAST search showed that the strain

belongs to the family *Enterobacteriaceae*, namely to the genus *Raoultella*, as the partial nucleotide sequence of 16S rDNA region of the strain in length of 1.35 kb showed the maximum nucleotide identity (over 99%) with the strains *R. planticola*, *R. ornithinolytica*, *Klebsiella* sp. or *Enterobacter* sp. strains. Since the results of the phylogenetic analysis are consistent with the phenotypic traits and there is a recent proposal of Drancourt et al. (2001) that, e.g. *Klebsiella planticola* and *Klebsiella ornitholytica* should be reclassified into the genus *Raoultella*, the previous identification of the strain, a *Raoultella* sp. KDF8, was not changed.

We have studied the effect of a growth temperature (20, 28 and 37°C) on the culture growth on an unnatural carbon source DCF. The data are shown in Table X. The highest degradation of DCF (92%) was achieved at 28°C in the course of 48 h when the biomass concentration reached 1.1 g_{dw}/l and the specific rate of removal (SRR) was 28 mg_{DCF}/g_{cdw}/h. The lower temperature did not affected significantly the growth but the biodegradation and SRR decreased to 55% and 13 mg_{DCF}/g_{cdw}/h, respectively. The temperature of 37°C was not suitable for the growth but the biodegradation was reasonable. The temperature of 28°C was used in further degradation/culture experiments performed both with DCF and another pollutant CD.

Table X. The effect of temperatures on growth and removal of DCF by growing cells after 48h

Temperature°(°C)	μ (h ⁻¹)	DW g/l	Degradation (%)	SRR (mg _{DCF} /g _{DW} /h)
20	0.05±0.01	0.72±0.05	55±2.05	13±0.2
28	0.08±0.01	1.10±0.12	92±2.05	28±0.9
37	0.03±0.005	0.22±0.03	82±1.63	23±1.0

DW and SRD stand for biomass concentration and specific utilization rate of DCF, respectively. μ means the specific growth rate of cultures. The experiments were performed in triplicate.

The growth curves of the shaken flask cultures of the strain KDF8 in mineral medium BSBTE supplemented with DCF or DC (1 g/L) under optimal growth temperature are shown in FIG. x. The culture supplemented with DCF entered exponential growth phase in 4th h after inoculation. Slowly growing culture with μ of 0.08 /h reached the stationary phase after approximately 48h. By that time, almost 100% of the DCF had been metabolized.

As to culture in CD-supplemented medium, the exponential growth started after 24h (μ of .../h) and the maximum concentration of the biomass was reached in 72h after inoculation. Consumption of only 30 % of the substrate was achieved.

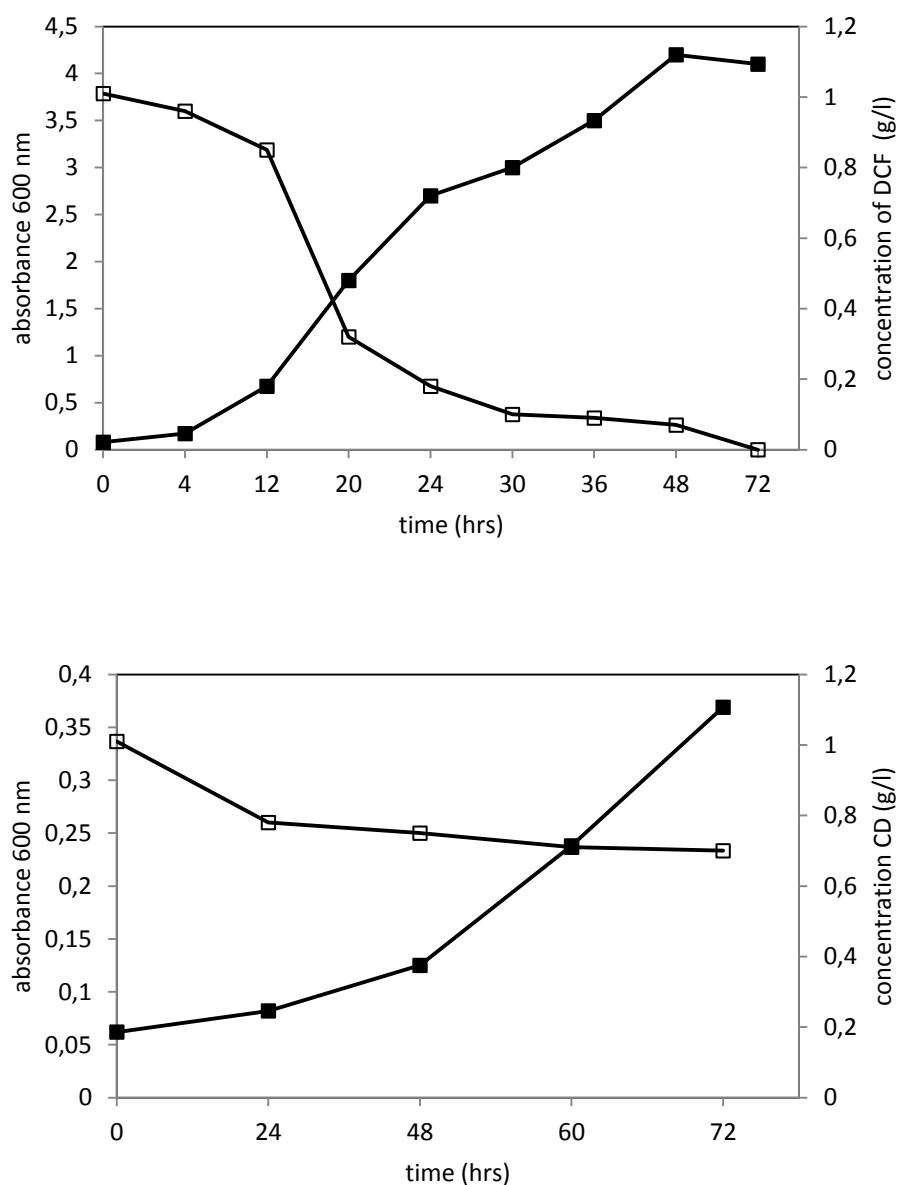


Fig.x Growth of a culture of the strain *Raoultella* sp. KDF8 in shaken flasks (28 °C) on medium BSBTE supplemented with 1 g/l of DCF (A) or CD (B): biomass concentration (OD600, full square) and residual concentration of DCF or CD (empty square, measured by HPLC).

We can conclude that the genus *Raoultella* ranks among very efficient biodegraders of DCF (92 % removal) and, although with lower efficiency (30% removal), simultaneously among degraders of CD. This is the first report on a bacterial biodegrader capable of nearly a complete degradation of the DCF (xenobiotics) and the drug CD, a natural product.

A complete utilization of the DCF by *R. sp* KDF8 is an important trait. A comparison with literature data shows that laboratory experiments with activated sludge from the wastewater treatment plant completely removed some pharmaceuticals (e.g. ibuprofen), whereas a residual concentration of the DCF was always present, showing the necessity to remove this pollutant by further treatment, for example, by means of activated carbon (Langenhoff et al., 2013). Other reports dealing with the DCF removal from aquatic environment by *Pseudomonas putida* MnB6 revealed that degradation of the drug required

manganese oxidation by (Meerburg et al., 2012). Regarding morphine alkaloids (e.g., the CD), these compounds were utilized as sole carbon and energy sources by the strain *Pseudomonas putida* isolated from industrial waste liquors (Bruce et al., 1990).

Kaczorek et al. (2016) has studied the strains *Raoultella planticola* WS2 and *Pseudomonas* sp. OS2 as potential biodegraders of halogenated phenols. Both strains displayed changes in inner membrane permeability and cell surface hydrophobicity during the growth in medium supplemented with halogenated phenols. Biodegradation of phenols was observed only in the case of the culture of *Pseudomonas* sp. OS2.

Raoultella sp. KDF8 as a whole cell catalyst for removal of DCF and CD

In previous chapter we have reported the strain *Raoultella* sp. KDF8 as an efficient degrader of the DCF and CD when cultured in a mineral medium supplemented with the drug at a concentration of 1 g/l where the final biomass concentration reaches about 1 g_{dw}/l (OD₆₀₀ about 4). Therefore we have performed experiments to evaluate the degradation potential of the strain *R. sp.* KDF8 for both drugs and to determine optimal conditions for catalyst application. The mcp cultures were performed with 10% (w/w) whole-cell catalyst/biomass (OD₆₀₀ of about 25) at the temperature of 28°C in the medium BSBTE supplemented with different concentrations of DCF (1.0 – 5.0 g/l) or CD (0.2 and 1.0 g/l), and pH value ranging from 3 to 10.

Effect of pH and DCF concentration.

The effect of pH on the culture growth and efficiency of the DCF removal is shown in Table X. The optimal initial pH range for biodegradation was 7 to 9. It should be noted that there is a slight increase in OD of the culture (by 20%) at pH of 6 and 7. The other pH values did not support neither biomass increase nor DCF degradation. Table X shows that the pH of the reaction mixtures reaches after 48 h the value ranging from 3.4 to 4.6 which corresponds to pH change during the culture growth (Fig. ...).

Table X. The effect of initial pH of the reaction on the DCF removal

pH ^{INI} /pH ^F	3/3.4	4/3.8	5/3.9	6/3.8	7/4.1	8/4.4	9/4.3	10/4.6
degradation (%)	46±3.4	47±2.9	55±4.1	60±1.7	92±2.1	87±2.4	88±1.7	49±3.1
OD ₆₀₀	25.2±0.4	26.5±1.0	25.3±0.6	31±0.5	30±0.3	25±0.8	25±0.8	23±0.8

pH^{INI} and pH^F stands for the initial pH of the reaction mixture and culture pH after 48h, respectively

Xenobiotic substrates subjected to biodegradation may inhibit growth of the bacterium via interference of substrates and their intermediates with the cell metabolism (Bühler et al., 2008; Tsotsou et al., 2016): a level of toxic effect of compounds may correlate with increasing

concentration of the drugs. On the other hand, high initial concentrations of the substrate may reveal biodegradation potential of the catalyst (Chen et al., 2010). Therefore we have studied growth inhibition of the *R. sp. KDF8* culture and degradation performance in the medium supplemented with DCF. The data are shown in Table XX.

Table XX Concentration effect of DCF on bacterial growth and the drug removal.

DCF concentration g L ⁻¹	DW g L ⁻¹		Degradation (%)		SRR mg _{DCF} g _{DW} ⁻¹ h ⁻¹	
	24 h	48h	24h	48h	24h	48h
1	6.5±0.32	7.3±0.73	80±1.20	92±1.95	12.0±0.4	5.0±0.3
2	6.7±0.25	7.2±0.35	87±1.60	88±1.27	10.0±0.2	5.0±0.3
3	6.3±0.24	6.5±0.3	67±0.75	71±0.84	23.0±1.2	10.0±0.4
4	5.3±0.08	6.1±0.04	47±0.95	65±1.10	27.0±0.8	13.5±0.6
5	4.7±0.12	4.9±0.07	55±1.17	63±0.75	24.0±0.6	16,5±0.4

Biodegradation was determined after 24 h and 48h by 10% (WW) cell suspension of *Raoultella sp. KDF8*. DW and SRR stand for biomass concentration and specific removal rate for DCF, respectively. Data are given as averaged values from three parallel mcp cultures.

Biodegradation was followed in mcp cultures at five different concentrations of DCF: 1, 2, 3, 4 and 5 g/L (Table XX) and we have found that the concentration of DCF affected both the degradation and culture growth. The degradation of DCF was faster (23 – 27 mg/g_{cdw}/h) at higher concentrations (3-5 g/l) but the growth was slowed down from 7.3 to 4.9 g_{dw}/l. The highest percentage (92%) of DCF removal was reached in the culture supplemented with 1.0 g/l of DCF after 48h of cultivation.

Optimized conditions for biodegradation by whole-cell catalyst of *Raoultella sp. KDF8* (10% ww biomass, 28°C) obtained from the previous experiments were used for the removal of another persisting analgesics, codeine. These conditions were applied in 5-ml mcp experiments to study the concentration effect of the pharmaceutical. The better elimination of CD was observed in medium supplemented with 0.2 g/l of CD indicating a 45% of drug removal after 48h, whereas significantly less pronounced removal occurred at concentration 1.0 g/l (Table X). At the concentration 0.2 g/l of CD, the specific removal rate is slower (2 mg_{CD}/g_{CDW}/h) and at 1.0 g/l the SRR increases up to 9.5 mg_{CD}/g_{CDW}/h after 24h. The use of the whole cells for CD conversion by *Rhizobium radiobacter* R89-1 at higher concentration of CD has been described by Kyslikova et al., 2013. Our results are in agreement with the cited work that reports faster CD conversion at higher concentrations of the drug.

Table X. Concentration effect of CD on bacterial growth (DW) and the drug removal.

Concentration of CD g L ⁻¹	degradation (%)		DW g L ⁻¹		SRR (mg _{CD} g _{DW} ⁻¹ h ⁻¹)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0.2	30±1.9	45±2.8	4.3±0.19	5.1±0.17	2.0±0.1	0.6±0.03
1.0	22±1.1	27±2.0	4.1±0.16	3.8±0.25	9.5±0.18	5.1±0.09

DW and SRR stand for biomass concentration and specific removal rate, respectively. Biodegradation was determined after 24 h and 48h by 10% (WW) cell suspension of *Raoultella* sp. KDF8. Data are given as averaged values from three parallel mcp cultures.

The metabolic profil of DCF and CD in *Raoultella* sp. KDF8

Virtually no information on metabolites of diclofenac transformation by microbial communities is currently available. Intermediates have been described only from conversions with cultures of fungi and yeasts. During biological treatment of DCF have been recently described for example O-nitrosation and nitration products of DCF and dichlorobenzoic acid (Perez et. Al., 2008), 2-((2,6-dichloro-phenyl) amino) benzyl alcohol methyl ether (Kosjek et al., 2009; Langenhoff et al., 2013), oxidation products such as 5-hydroxy-, 4'-hydroxyl- and 3'-hydroxyl diclofenac, 4'-5-dihydroxydiclofenac (Hata et al., 2010; Scheurell et al., 2009) and 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one (Kosjek et al., 2009). The analysis of three culture samples from different growth phase led to detection metabolite produced after biodegradation of DCF by nature bacterial strain. This metabolite extracted from cultures of *Roultella* sp. KDF8 and characterized by 4'-hydroxy diclofenac (4'-OH-DCF). 4'-OH-DCF was shown to be the predominant metabolite and have been also detected in incubations with activated sludge (Bouju et al., 2016; Gröning et al., 2007). This results demonstrate that the hydroxylation of DCF to 4'-OH-DCF isn't a bottleneck in overall DCF biotransformation by nature bacterial strain.

When codeine was degraded by natural strain *Raoultella* sp. KDF8, five predominant metabolites were observed in culture samples, some of them have been found in other studies: codeinone, 14-OH-codeine, 14-OH-codeinone, 14-OH-7,8-dihydrocodeine and 14-OH-7,8-dihydrocodeinone (Kyslikova et al., 2013). This clearly indicates the presence of morphine-6-dehydrogenase and morphinone reductase catalysed reactions (PMID: 8452544)(PMID: 8037698)(PMID: 27056219). Our metabolic study also confirmed the presence of neopine or isoneopine (MW 300.159) which is in non-enzymatic equilibrium with codeinone (doi:10.1016/S0040-4039(00)73838-X).